



**Inês Maria Mantinhas Pataco**

Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

## **Biofortificação de trigo duro (*Triticum durum*) em ferro, e seriação de parâmetros de qualidade para fabrico industrial de massas alimentícias**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em  
Qualidade Alimentar

Orientador: Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo, Professor Auxiliar com Agregação, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutor Fernando José Cebola Lidon, Professor Associado com Agregação, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Fernando José Pires Santana

Arguentes: Prof. Doutor Augusto Manuel Nogueira Gomes Correia

Doutor Benvindo Martins Maçãs

Prof. Doutor Fernando José Cebola Lidon

Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando



**Setembro de 2016**





**Inês Maria Mantinhas Pataco**

Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

## **Biofortificação de trigo duro (*Triticum durum*) em ferro, e seriação de parâmetros de qualidade para fabrico industrial de massas alimentícias**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em  
Qualidade Alimentar

Orientador: Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo, Professor Auxiliar com Agregação, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutor Fernando José Cebola Lidon, Professor Associado com Agregação, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Fernando José Pires Santana

Arguentes: Prof. Doutor Augusto Manuel Nogueira Gomes Correia  
Doutor Benvindo Martins Maçãs  
Prof. Doutor Fernando José Cebola Lidon  
Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Setembro de 2016**

## **Copyright**

Copyright © - Todos os direitos reservados. Inês Maria Mantinhas Pataco. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

“Biofortificação de trigo duro (*Triticum durum*) em ferro, e seriação de parâmetros de qualidade para fabrico industrial de massas alimentícias”.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

Ao apresentar esta dissertação, desejo expressar os meus agradecimentos a todas as pessoas e instituições que, de algum modo, tornaram possível a sua concretização:

Ao Departamento de Ciências da Terra (DCT) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL) pela cedência das instalações laboratoriais, conducentes à elaboração desta dissertação.

Ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), com destaque para a Estação Nacional de Melhoramento de Plantas de Elvas, Departamento de Cereais (ENMP), pelos meios que proporcionou para a instalação e condução dos ensaios de campo e à Estação Agronómica Nacional em Oeiras, Departamento de Fisiologia Vegetal (EAN) pela cedência de estufas para o crescimento das plantas em ambiente controlado.

Ao Departamento de Física (DF) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL), Laboratório de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Física da Radiação, particularmente ao Professor Doutor José Paulo Santos, Doutor Mauro Guerra e Mestre Inês Ramos pela realização de análises laboratoriais.

Aos meus orientadores Professor Doutor Fernando Lidon, pela orientação científica, pelos conhecimentos transmitidos, pelas preciosas sugestões de melhoria, pela confiança que em mim depositou e ainda pelo apoio e ânimos transmitidos, os quais foram de grande importância para a concretização da presente dissertação e ao Professor Doutor Fernando Reboredo, pelo apoio, incentivo, disponibilidade e partilha de conhecimentos.

À Professora Doutora Fernanda Pessoa, pela amizade, disponibilidade, palavras de incentivo e ainda pelas sugestões e comentários na revisão desta dissertação.

Ao Doutor José Cochicho Ramalho do Instituto de Investigação Científica e Tropical (IICT), pelos ensinamentos e apoio fornecidos no âmbito de análises efetuadas em ambiente controlado.

À Dra. Paula Scotti e ao Engº José Semedo, da EAN/INIAV, pela paciência, simpatia e ensinamento das técnicas no âmbito dos ensaios em ambiente controlado.

Ao Engº Eduardo Leitão do Instituto de Investigação Científica e Tropical (IICT) por todo o apoio e ensinamento prestado na realização de análises laboratoriais para determinação dos açúcares.

À Doutora Ana Sofia Bagulho, da ENMP/INIAV, pelo apoio prestado na realização de algumas análises de qualidade e à Doutora Ana Sofia Almeida pela disponibilidade, apoio incansável e partilha de conhecimentos durante o desenvolvimento do trabalho.

À Técnica Isabel Pais, da EAN/INIAV, pela sua incansável paciência, amizade, dedicação, organização e pelo apoio prestado na realização de análises laboratoriais aquando da determinação dos ácidos gordos.

Aos meus pais Maria da Conceição Pataco e António Pataco, por todo o amor, carinho, transmissão de valores e lealdade, pelas críticas construtivas que me foram fazendo ao longo da vida, permitindo que caminhasse em solo firme. Agradeço por todos os dias fazerem de mim uma pessoa melhor.

À minha irmã Lúcia Pataco, por fazer parte da minha vida e partilhar comigo todas as alegrias. À restante família, avós e tios, pelo apoio.

Ao meu namorado André Ribeiro pelo apoio, paciência, compreensão, amor e companheirismo. Pela disponibilidade e ajuda na realização da presente dissertação.

Aos meus amigos e colegas de Doutoramento Karlana Oliveira, Mara Mourinho e João Pelica pelo companheirismo, amizade, convivência e pelos momentos únicos nesta caminhada.

Aos meus amigos e a todos os intervenientes que tornaram esta experiência possível, o meu sincero obrigado.

## Resumo

Entre as culturas alimentares amplamente cultivadas, o trigo desempenha um papel particularmente importante na ingestão diária de alimentos e subsequente obtenção de energia, sobretudo nos países em desenvolvimento. Neste contexto, a biofortificação de trigo duro, o mais tolerante de todas as espécies de trigo e ainda um alimento básico, pode adquirir um impacto mensurável e positivo na saúde humana. Seguindo esta perspetiva e considerando a elasticidade metabólica de *Triticum durum*, a biofortificação de grãos com elementos minerais visando a produção de massas alimentícias justificou este estudo.

As plantas foram cultivadas numa câmara de crescimento em condições ambientais controladas e submetidas, recorrendo à aplicação da solução nutritiva de Hoagland e, relativamente ao controlo, a níveis de fertilização progressivamente mais elevados (2, 4 e 6 vezes). As plantas também foram cultivadas em estufa, em Oeiras, recorrendo à aplicação de um sistema de fertilização idêntico e num campo experimental, em Elvas, Herdade da Comenda (Coordenadas GPS – 38° 41'N / 9° 18'W / altitude: 25m e 38° 54'N / 7° 09'W / altitude: 272m, respetivamente). Neste último ensaio, as plantas foram submetidas a uma adubação clássica da cultura e adicionalmente a uma aplicação foliar com diferentes teores de ferro (8,1 g, 16,2 g, 32,4 g e 64,8 g de ferro quelatado) diluídas em 0,3L de água. No âmbito do itinerário técnico para biofortificação de trigo duro (*Triticum durum*) cv. Marialva em micro e macronutrientes, caracterizou-se a cinética de absorção radicular, translocação para a parte aérea e deposição na semente destas entidades químicas. Quantificou-se ainda a taxa de mobilização de fotoassimilados para o grão, assim como as propriedades físicas, químicas e tecnológicas da sêmola biofortificada. Os resultados obtidos em ambiente controlado, estufa e cultura de campo indicaram que o limiar de toxicidade não foi alcançado entre os diferentes tratamentos. Considerando a interação entre o rendimento do grão e a acumulação de micro e macronutrientes, o tratamento submetido ao dobro dos teores de micro/macronutrientes foi o mais favorável para a biofortificação. No entanto, como todos os nutrientes (exceto o Cu e em grande medida o Zn) prevalecem no embrião e farelo dos grãos, a produção de massas alimentícias biofortificadas para consumo humano exige especificamente o uso de sêmola integral.

**Palavras-chave:** Acumulação de nutrientes; Biofortificação; Sêmola; *Triticum durum*





## Abstract

Among the widely cultivated food crops, wheat plays a relevant role in daily food consumption and energy intake, especially in the developing countries. In this context, the biofortification of durum wheat, the most tolerant of all wheat species and still a basic crop, can achieve a measurable and positive impact on human health. Following this perspective, considering the metabolic elasticity of *Triticum durum*, the biofortification of grains with minerals for pasta production prompts this study.

Plants were grown in a growth chamber under environmental controlled conditions and submitted to different fertilizer treatment (2, 4 and 6 fold). Plants were also grown in a greenhouse tests were made, in Oeiras, following the same fertilizer treatments and in an experimental field in Elvas, Herdade da Comenda (GPS – N 38°41'53,419'' / W 9°19'7,763'' e N 38°53'19,797'' / W 7°8'49,435'', respectively). In this case, the plants were submitted a classic soil fertilization and additionally to a foliar application with iron concentrations (8,1 g, 16,2 g, 32,4 g and 64,8 g of chelated iron) diluted in 0,3L of water. This thesis aims to study the durum wheat biofortification (*Triticum durum*) cv. Marialva in micro and macronutrients, being evaluated the kinetics of root uptake, translocation to the shoot and grain deposition of these chemical entities. It was intended to quantify the photoassimilate rate to the seed, as well as the physical, chemical and technological properties of biofortified semolina. Data obtained in controlled environment, greenhouse and experimental field conditions indicated that the threshold of toxicity was not reached between the different treatments. Considering the interaction between grain yield and the accumulation of micro and macronutrients, treatment submitted to 2 fold amounts of nutrients was found to be the best for biofortification. Nevertheless, as all nutrients (excepting Cu and largely Zn) prevailed in the bran and embryo of the grains, the production of biofortified pasta for human consumption specifically requires the use of integral semolina.

**Keywords:** Biofortification; Nutrients accumulation; Semolina; *Triticum durum*



## Lista de abreviaturas

AGT	Ácidos Gordos Totais
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
Chl	Chlorophyll
C <sub>i</sub>	Concentração Intercelular de CO <sub>2</sub>
CPD	Critical Point Dryer
Ctl	Controlo
cv	Cultivar
DBI	<i>Double Bond Index</i>
DCT	Departamento de Ciências da Terra
DF	Departamento de Física
DM	Digital Microscopes
DRI	<i>Dietary Reference Intakes</i>
EAN	Estação Agronómica Nacional
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EDXRF	Energy Dispersive X-Ray Fluorescence
ENMP	Estação Nacional de Melhoramento de Plantas
ETR	<i>Electron Transport Rate</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
F <sub>m</sub>	Fluorescência Máxima
F <sub>o</sub>	Fluorescência Inicial Mínima
F <sub>v</sub>	Fluorescência Variável
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	Eficiência Fotoquímica Máxima do Fotossistema II
F <sub>v</sub> '/F <sub>m</sub> '	Eficiência da Conversão de Energia do Fotossistema II
g <sub>s</sub>	Condutância Estomática
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Resolução)
<i>i.e.</i>	<i>Id est</i>
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy
IICT	Instituto de Investigação Científica e Tropical
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
LHC	<i>Light Harvesting Complex</i>
NIST	National Institute of Standards and Technology
NP	Norma Portuguesa
NPQ	Fator de Amortecimento Não-fotoquímico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAR	Photosynthetically Active Radiance – Radiação Fotossintética Activa

**Biofortificação de trigo duro (*Triticum durum*) em ferro, e seriação de parâmetros de qualidade  
para fabrico industrial de massas alimentícias**

---

PMG	Peso de Mil Grãos
P <sub>n</sub>	Taxa Fotossintética Líquida
PS	Peso Seco
PS II	Fotossistema II
Q <sub>A</sub>	Quinona A
q <sub>L</sub>	<i>Photochemical Quenching</i>
q <sub>N</sub>	<i>Nonphotochemical Quenching</i>
q <sub>P</sub>	Fator de Amortecimento Fotoquímico
SDD	Silicon Drift Detector
SDS	Volume de Sedimentação do Teste SDS - Reagente Dodecil Sulfato de Sódio
t <sub>1</sub>	Colheita 16 dias Após a Germinação
t <sub>2</sub>	Colheita 70 dias Após a Germinação
t <sub>3</sub>	Colheita 92 dias Após a Germinação
t <sub>4</sub>	Colheita 126 dias Após a Germinação
USA	United States of America
Y <sub>(NO)</sub>	Estimate of the Quantum Yield of Nonregulated Energy (heat and fluorescence) Dissipation of PSII
Y <sub>(NPQ)</sub>	Estimate of the Quantum Yield of Regulated Energy Dissipation of PSII
φ <sub>e</sub>	Estimate of the Quantum Yield of Photosynthetic Noncyclic Electron Transport

## Índice de matérias

Agradecimentos .....	I
Resumo .....	III
Abstract.....	V
Lista de abreviaturas .....	VII
Índice de matérias .....	IX
Índice de figuras .....	XIII
Índice de tabelas .....	XIX
<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I – Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>5</b>
1.1- Produção e consumo mundial .....	5
1.2- Caracterização do grão de trigo .....	7
1.3- Importância do trigo duro .....	8
1.4- Estratégias de biofortificação.....	9
1.5- Processamento industrial de trigo duro.....	12
1.6- Absorção de elementos minerais em animais .....	14
<b>Capítulo II - Materiais e Métodos .....</b>	<b>21</b>
2.1 Material biológico .....	21
2.2 Implementação das culturas .....	21
2.2.1 Crescimento em ambiente controlado .....	21
2.2.2 Crescimento em estufa .....	22
2.2.3 Crescimento em cultura de campo.....	24
2.3 Métodos analíticos .....	26
2.3.1 Elementos minerais .....	26
2.3.1.1 Determinação do peso seco .....	26
2.3.1.2 Espectrofluorimetria acoplada com raio x.....	26
2.3.1.3 Espectrofotometria de absorção atômica.....	27

2.3.1.4 Fluorescência de raios X .....	28
2.3.2 Microscopia eletrônica de varrimento .....	29
2.3.3 Microscopia ótica .....	29
2.3.4 Trocas gasosas foliares .....	30
2.3.5 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	30
2.3.6 Fração lipídica total e ácidos gordos .....	31
2.3.7 Açúcares .....	32
2.3.8 Proteínas .....	33
2.3.9 Índice de sedimentação SDS .....	34
2.3.10 Cor .....	34
2.3.11 Humidade .....	35
2.3.12 Cinzas .....	36
2.3.13 Vitreosidade.....	36
2.3.14 Peso de mil grãos.....	36
2.4 Tratamento estatístico .....	37
<b>Capítulo III - Resultados e Discussão .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Biofortificação em ambiente controlado .....</b>	<b>39</b>
3.1.1 Desenvolvimento fenológico e produção de biomassa.....	39
3.1.2 Nutrição mineral.....	45
3.1.2.1 Mobilização e acumulação de elementos minerais .....	45
3.1.2.1.1 Micronutrientes .....	45
3.1.2.1.1.1 Ferro .....	45
3.1.2.1.1.2 Cobre .....	48
3.1.2.1.1.3 Manganês .....	50
3.1.2.1.1.4 Zinco.....	53
3.1.2.1.2 Macronutrientes.....	57
3.1.2.1.2.1 Cálcio .....	57
3.1.2.1.2.2 Potássio.....	60

**Biofortificação de trigo duro (*Triticum durum*) em ferro, e seriação de parâmetros de qualidade  
para fabrico industrial de massas alimentícias**

---

3.1.2.1.2.3 Magnésio .....	62
3.1.2.1.2.4 Fósforo .....	64
3.1.2.2. Taxas de acumulação total .....	67
3.1.2.2.1 Ferro .....	67
3.1.2.2.2 Cobre .....	68
3.1.2.2.3 Manganês .....	69
3.1.2.2.4 Zinco .....	70
3.1.2.2.5 Cálcio .....	71
3.1.2.2.6 Potássio.....	72
3.1.2.2.7 Magnésio .....	73
3.1.2.2.8 Fósforo .....	74
3.1.2.3 Cinética de Absorção e Translocação .....	75
3.1.2.3.1 Micronutrientes .....	75
3.1.2.3.2 Macronutrientes.....	78
3.1.3 Cinética de síntese de fotoassimilados .....	80
3.1.4 Composição do grão .....	96
3.1.4.1. Localização de elementos minerais .....	96
3.1.4.2 Fração lipídica total e composição em ácidos gordos .....	102
3.1.4.3 Glícidos .....	107
3.1.4.4 Proteínas e fração azotada .....	110
3.1.4.5 Características tecnológicas .....	113
3.1.4.5.1 Índice de sedimentação SDS .....	113
3.1.4.5.2 Cinzas .....	114
3.1.4.5.3 Cor.....	115
<b>3.2. Biofortificação em estufa .....</b>	<b>118</b>
3.2.1 Composição do grão .....	118
3.2.1.1 Elementos minerais .....	118
3.2.1.2 Fração lipídica total e composição em ácidos gordos .....	120



3.2.1.3	Glícidos .....	123
3.2.1.4	Proteínas e fração azotada .....	125
3.2.1.5	Características tecnológicas .....	126
3.2.1.5.1	Índice de sedimentação SDS .....	126
3.2.1.5.2	Cinzas .....	126
3.2.1.5.3	Cor .....	127
<b>3.3.</b>	<b>Biofortificação em campo .....</b>	<b>130</b>
3.3.1	Composição do grão .....	130
3.3.1.1	Elementos minerais .....	130
3.3.1.2	Fração lipídica total e composição em ácidos gordos .....	132
3.3.1.3	Glícidos .....	136
3.3.1.4	Proteínas e fração azotada .....	137
3.3.1.5	Características tecnológicas .....	138
3.3.1.5.1	Humidade .....	138
3.3.1.5.2	Índice de sedimentação SDS .....	139
3.3.1.5.3	Cinzas .....	140
3.3.1.5.4	Vitreosidade .....	141
3.3.1.5.5	Peso de mil grãos.....	142
3.3.1.5.6	Cor .....	143
<b>Capítulo IV -</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>147</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>		<b>151</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b> - Evolução da superfície cultivada com trigo em Portugal.....	5
<b>Figura 1.2</b> - Evolução da produção total de trigo em Portugal.....	5
<b>Figura 1.3</b> - Espiga de trigo mole (à esquerda) e de trigo duro (à direita).....	7
<b>Figura 1.4</b> - Diversidade de produtos alimentares obtidos a partir do trigo.....	12
<b>Figura 2.1</b> - Aspetos do desenvolvimento das plantas da <i>Triticum durum</i> , variedade Marialva, em estufa, em diferentes estádios fenológicos: Emborrachamento (A); Espigamento (B); Ântese (C); Maturação fisiológica (D).....	20
<b>Figura 2.2</b> - Condições ambientais verificadas no ensaio em estufa entre dezembro de 2013 e maio de 2014. Temperatura do solo (A), temperatura do ar interior (B) e respetiva humidade (C), temperatura exterior (D) e radiação fotossintética ativa (E).....	21
<b>Figura 2.3</b> - Perspetiva geral do crescimento de plantas da variedade de <i>Triticum durum</i> (Marialva), em campo experimental. Detalhe (A) e aspeto geral do ensaio (B).....	22
<b>Figura 2.4</b> - Condições climáticas verificadas no ensaio em campo experimental durante o período de dezembro de 2013 e maio de 2014. Temperatura ambiente mínima e máxima (A), Precipitação (B) e Radiação solar global mensal (C).....	23
<b>Figura 2.5</b> - Representação esquemática do conceito de deteção de minerais com emissão de raios-X, através de analisadores portáteis Niton.....	24
<b>Figura 2.6</b> - Exemplo de um espectro eletromagnético na gama dos raios-X realizado numa amostra de solo.....	25
<b>Figura 2.7</b> - Exemplo de uma imagem da epiderme, contendo estomas, de uma amostra da folha bandeira de <i>Triticum durum</i> , obtida por microscopia ótica.....	27
<b>Figura 2.8</b> - Exemplo de um registo espectral relativo à separação de ácidos gordos, obtido de acordo com o procedimento adotado para separação e quantificação de ácidos gordos.....	30
<b>Figura 2.9</b> - Exemplo de um registo espectral relativo a padrões dos glícidos, de acordo com o procedimento adotado para separação e quantificação de glícidos.....	31
<b>Figura 2.10</b> - Representação de um modelo de espaço colorimétrico CIELab, em que L* representa a escala de cor entre o preto (0) e o branco (100), a* varia entre o verde (-) e o vermelho (+), e b* varia entre o azul (-) e o amarelo (+).....	33
<b>Figura 2.11</b> - Grão não vítreo (A) e totalmente vítreo (B).....	34
<b>Figura 3.1</b> - Aspetos do desenvolvimento da <i>Triticum durum</i> , variedade Marialva em diferentes estádios fenológicos com aplicação da escala de Zadoks.....	37
<b>Figura 3.2</b> - Aspetos do desenvolvimento da <i>Triticum durum</i> , variedade Marialva em diferentes estádios fenológicos e tratamentos com aplicação da escala de Zadoks.....	38
<b>Figura 3.3</b> - Biomassa seca média da raiz e respetivo erro padrão (n = 3) para cada concentração e colheita.....	39
<b>Figura 3.4</b> - Biomassa seca média da parte aérea e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	40
<b>Figura 3.5</b> - Razão entre os pesos secos médios da raiz e da parte aérea (A) e razão entre os pesos frescos médios da raiz e da parte aérea (B), para cada concentração e colheita.....	41

<b>Figura 3.6</b> - Percentagem do peso seco da raiz (A) e da parte aérea (B), nas diferentes amostras, para cada concentração e colheita.....	42
<b>Figura 3.7</b> - Concentração de ferro na raiz e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	43
<b>Figura 3.8</b> - Concentração de ferro na parte aérea e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	44
<b>Figura 3.9</b> - Concentração de ferro no grão e respetivo erro padrão (n = 2), para cada concentração referente à última colheita. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferenças significativas entre as concentrações estudadas.....	45
<b>Figura 3.10</b> - Concentração de cobre na raiz (A) e parte aérea (B) e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	46
<b>Figura 3.11</b> - Concentração de cobre no grão e respetivo erro padrão (n = 2), para cada concentração referente à última colheita. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferenças significativas entre as concentrações estudadas.....	48
<b>Figura 3.12</b> - Concentração de manganês na raiz e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	49
<b>Figura 3.13</b> - Concentração de manganês na parte aérea e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	50
<b>Figura 3.14</b> - Concentração de manganês no grão e respetivo erro padrão (n = 2), para cada concentração referente à última colheita. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre as concentrações estudadas.....	51
<b>Figura 3.15</b> - Concentração de zinco na raiz e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	52
<b>Figura 3.16</b> - Concentração de zinco na parte aérea e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	53
<b>Figura 3.17</b> - Concentração de zinco no grão e respetivo erro padrão (n = 2), para cada concentração referente à última colheita. A letra <i>a</i> indica que não existem diferenças significativas entre as concentrações estudadas.....	54
<b>Figura 3.18</b> - Concentração de cálcio na raiz e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	55
<b>Figura 3.19</b> - Concentração de cálcio na parte aérea e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	56
<b>Figura 3.20</b> - Concentração de cálcio no grão e respetivo erro padrão (n = 2), para cada concentração referente à última colheita. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre as concentrações estudadas.....	57
<b>Figura 3.21</b> - Concentração de potássio na raiz (A) e parte aérea (B) e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	58
<b>Figura 3.22</b> - Concentração de potássio no grão e respetivo erro padrão (n = 2), para cada concentração referente à última colheita. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> indicam diferenças significativas entre as concentrações estudadas.....	59
<b>Figura 3.23</b> - Concentração de magnésio na raiz e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	60
<b>Figura 3.24</b> - Concentração de magnésio na parte aérea e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	61
<b>Figura 3.25</b> - Concentração de magnésio no grão e respetivo erro padrão (n = 2), para cada concentração referente à última colheita. A letra <i>a</i> indica que não existem diferenças significativas entre as concentrações estudadas.....	62
<b>Figura 3.26</b> - Concentração de fósforo na raiz e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	62

<b>Figura 3.27</b> - Concentração de fósforo na parte aérea e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.....	63
<b>Figura 3.28</b> - Concentração de fósforo no grão e respetivo erro padrão (n = 2), para cada concentração referente à última colheita. A letra <i>a</i> indica que não existem diferenças significativas entre as concentrações estudadas.....	64
<b>Figura 3.29</b> - Taxa de absorção média diária (A), taxa de translocação diária média para cada concentração e colheita (B) e taxa de mobilização média para o grão para cada concentração (C).....	75
<b>Figura 3.30</b> - Taxa de absorção média diária (A), taxa de translocação diária média para cada concentração e colheita (B) e taxa de mobilização média para o grão para cada concentração (C).....	77
<b>Figura 3.31</b> - Taxa fotossintética líquida dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.....	79
<b>Figura 3.32</b> - Condutância estomática dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.....	80
<b>Figura 3.33</b> - Imagens ilustrativas da epiderme, contendo estomas, de uma amostra da folha bandeira de <i>Triticum durum</i> , variedade Marialva, obtida por microscopia ótica, para os diferentes tratamentos: 15 mL (A); 30 mL (B); 60 mL (C); 90 mL (D), 20 dias após a germinação (ampliação 10x).....	81
<b>Figura 3.34</b> - Concentração intercelular de CO <sub>2</sub> dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.....	82
<b>Figura 3.35</b> - F <sub>0</sub> dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.....	84
<b>Figura 3.36</b> - F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.....	85
<b>Figura 3.37</b> - F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> ' dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.....	86
<b>Figura 3.38</b> - $\phi_e$ dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.....	87
<b>Figura 3.39</b> - ETR dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.....	88
<b>Figura 3.40</b> - Y <sub>(NPQ)</sub> dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.....	89
<b>Figura 3.41</b> - Y <sub>(NO)</sub> dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.....	90
<b>Figura 3.42</b> - NPQ dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.....	91

<b>Figura 3.43</b> - $q_p$ dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão ( $n = 4$ ) para cada concentração e dia de ensaio.....	92
<b>Figura 3.44</b> - $q_L$ dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão ( $n = 4$ ) para cada concentração e dia de ensaio.....	93
<b>Figura 3.45</b> - Caracterização do grão de trigo com representação dos seus componentes principais: farelo (A), endosperma (B), embrião (C) e zona basal do embrião (D).....	95
<b>Figura 3.46</b> - Imagens de uma semente de trigo duro selecionada longitudinalmente através de análise espectrométrica por fluorescência de raios X de distintos elementos minerais: Microscopia eletrónica de varrimento (1 e 1a); Fe (2); Zn (3); Mn (4); Cu (5); K (6); P (7); Ca (8) e S (9), referente aos tratamentos 15 mL (a) e 90 mL (b).....	96
<b>Figura 3.47</b> - Microscopia eletrónica de varrimento acoplada a microanálise de raios X e localização de elementos minerais na semente, particularmente no embrião (A), região equatorial do endosperma (B) e região apical terminal (C) para os tratamentos 15 mL (1) e 90 mL (2).....	98
<b>Figura 3.48</b> - Registo espectral da deposição de Mg (1), P (2), K (3), Ca (4), Mn (5), Fe (6), Cu (7) e Zn (8) respetivamente, referente aos tratamentos 15 mL (a) e 90 mL (b), segundo o corte longitudinal da semente, conforme indicado pelo traçado azul.....	99
<b>Figura 3.49</b> - Ácidos gordos totais (AGT) no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferenças significativas entre as concentrações estudadas.....	102
<b>Figura 3.50</b> - Índice de insaturação (DBI) no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos estudados.....	102
<b>Figura 3.51</b> - Percentagem dos ácidos gordos mais abundantes ( $> 0,5\%$ ) no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.....	103
<b>Figura 3.52</b> - Percentagem dos ácidos gordos menos representativos ( $< 1\%$ ) no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.....	104
<b>Figura 3.53</b> - Teor médio de glícidos no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.....	106
<b>Figura 3.54</b> - Teor médio de glícidos no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.....	107
<b>Figura 3.55</b> - Teor médio de proteínas no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.....	110
<b>Figura 3.56</b> - Volume de sedimentação (SDS) no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.....	111
<b>Figura 3.57</b> - Teor médio de cinzas no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.....	112
<b>Figura 3.58</b> - Concentração de micronutrientes no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.....	116
<b>Figura 3.59</b> - Concentração de macronutrientes no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.....	117
<b>Figura 3.60</b> - Ácidos gordos totais (AGT) no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos estudados.....	118

<b>Figura 3.61</b> - Índice de insaturação (DBI) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos estudados.....	119
<b>Figura 3.62</b> - Percentagem dos ácidos gordos mais abundantes (> 0,5 %) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.....	119
<b>Figura 3.63</b> - Percentagem dos ácidos gordos menos representativos (< 1 %) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento e ácido gordo.....	120
<b>Figura 3.64</b> - Teor médio de glícidos no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.....	122
<b>Figura 3.65</b> - Teor médio de proteínas no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.....	123
<b>Figura 3.66</b> - Volume de sedimentação (SDS) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.....	124
<b>Figura 3.67</b> - Teor médio de cinzas no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos estudados.....	125
<b>Figura 3.68</b> - Concentração de micronutrientes no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.....	128
<b>Figura 3.69</b> - Concentração de macronutrientes no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.....	129
<b>Figura 3.70</b> - Ácidos gordos totais (AGT) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos.....	131
<b>Figura 3.71</b> - Índice de insaturação (DBI) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos estudados.....	131
<b>Figura 3.72</b> - Percentagem dos ácidos gordos mais abundantes (> 0,5 %) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.....	132
<b>Figura 3.73</b> - Percentagem dos ácidos gordos menos representativos (< 1 %) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.....	133
<b>Figura 3.74</b> - Teor médio de glícidos no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.....	134
<b>Figura 3.75</b> - Teor médio de proteínas no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos estudados.....	136
<b>Figura 3.76</b> - Teor médio de humidade no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.....	137
<b>Figura 3.77</b> - Volume de sedimentação (SDS) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos.....	138
<b>Figura 3.78</b> - Teor médio de cinzas no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos estudados.....	139
<b>Figura 3.79</b> - Vitreosidade do grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. A letra <i>a</i> indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos estudados.....	140
<b>Figura 3.80</b> - Peso de mil grãos e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos.....	141



## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Concentração de ferro no grão de trigo duro.....	6
<b>Tabela 2.1</b> - Operações culturais efetuadas no campo experimental da Herdade da Comenda em Elvas (38° 54'N; 7° 09'W; altitude - 272m).....	23
<b>Tabela 3.1</b> - Integração temporal do desenvolvimento da <i>Triticum durum</i> variedade Marialva..	37
<b>Tabela 3.2</b> - Média do peso seco da raiz, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) do peso seco da raiz (g) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b, c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s</i> mostram as diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	40
<b>Tabela 3.3</b> - Média do peso seco da parte aérea, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) do peso seco da parte aérea (g) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. A letra <i>r</i> indica que não existem diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	41
<b>Tabela 3.4</b> - Média da concentração de ferro, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) da concentração de ferro na raiz ( $\text{mg kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	43
<b>Tabela 3.5</b> - Média da concentração de ferro, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) da concentração de ferro na parte aérea ( $\text{mg kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s, t</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	44
<b>Tabela 3.6</b> - Média da concentração de cobre, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) da concentração de cobre na raiz e parte aérea ( $\text{mg kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	47
<b>Tabela 3.7</b> - Média da concentração de manganês, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) da concentração de manganês na raiz ( $\text{mg kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b, c, d</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s, t</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	49
<b>Tabela 3.8</b> - Média da concentração de manganês, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) da concentração de manganês na parte aérea ( $\text{mg kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b, c, d</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita.	



As letras <i>r, s, t</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	50
<b>Tabela 3.9</b> - Média da concentração de zinco, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05\%$ ) da concentração de zinco na raiz ( $\text{mg kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	53
<b>Tabela 3.10</b> - Média da concentração de zinco, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05\%$ ) da concentração de zinco na parte aérea ( $\text{mg kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b, c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s, t, u</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	54
<b>Tabela 3.11</b> - Média da concentração de cálcio, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05\%$ ) da concentração de cálcio na raiz ( $\text{g kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s, t</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	56
<b>Tabela 3.12</b> - Média da concentração de cálcio, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05\%$ ) da concentração de cálcio na parte aérea ( $\text{g kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b, c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s, t</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	57
<b>Tabela 3.13</b> - Média da concentração de potássio, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05\%$ ) da concentração de potássio na raiz e parte aérea ( $\text{g kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s, t</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	58
<b>Tabela 3.14</b> - Média da concentração de magnésio, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05\%$ ) da concentração de magnésio na raiz ( $\text{g kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s, t</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	60
<b>Tabela 3.15</b> - Média da concentração de magnésio, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05\%$ ) da concentração de magnésio na parte aérea ( $\text{g kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a, b, c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r, s, t</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	61
<b>Tabela 3.16</b> - Média da concentração de fósforo, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05\%$ ) da concentração de fósforo na raiz ( $\text{g kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. A letra <i>a</i> indica que não existem diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As	

letras <i>r</i> , <i>s</i> , <i>t</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	63
<b>Tabela 3.17</b> - Média da concentração de fósforo, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) da concentração de fósforo na parte aérea ( $\text{g kg}^{-1}$ peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras <i>r</i> , <i>s</i> , <i>t</i> indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.....	64
<b>Tabela 3.18</b> - Acumulação total de ferro referente à raiz, parte aérea e grão ( $n = 3$ ), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.....	65
<b>Tabela 3.19</b> - Acumulação total de cobre referente à raiz, parte aérea e grão ( $n = 3$ ), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.....	66
<b>Tabela 3.20</b> - Acumulação total de manganês referente à raiz, parte aérea e grão ( $n = 3$ ), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.....	67
<b>Tabela 3.21</b> - Acumulação total de zinco referente à raiz, parte aérea e grão ( $n = 3$ ), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.....	68
<b>Tabela 3.22</b> - Acumulação total de cálcio referente à raiz, parte aérea e grão ( $n = 3$ ), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.....	69
<b>Tabela 3.23</b> - Acumulação total de potássio referente à raiz, parte aérea e grão ( $n = 3$ ), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.....	70
<b>Tabela 3.24</b> - Acumulação total de magnésio referente à raiz, parte aérea e grão ( $n = 3$ ), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.....	71
<b>Tabela 3.25</b> - Acumulação total de fósforo referente à raiz, parte aérea e grão ( $n = 3$ ), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.....	72
<b>Tabela 3.26</b> - Média da taxa fotossintética líquida, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) da taxa fotossintética líquida ( $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r</i> , <i>s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento...	79
<b>Tabela 3.27</b> - Média da condutância estomática, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) da condutância estomática ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r</i> , <i>s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento...	80
<b>Tabela 3.28</b> - Média da contagem de estomas, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) da contagem de estomas efetuada nas páginas adaxial e abaxial das folhas. A letra <i>a</i> indica ausência de diferenças significativas entre os tratamentos em cada página da folha. A letra <i>r</i> indica ausência de diferenças significativas entre as várias páginas da folha, para cada tratamento.....	81
<b>Tabela 3.29</b> - Média da concentração intercelular de $\text{CO}_2$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) da concentração intercelular de $\text{CO}_2$ ( $\text{mL L}^{-1}$ ) para as	

diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. A letra <i>r</i> indica ausência de diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.....	83
<b>Tabela 3.30</b> - Média da $F_0$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da $F_0$ para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. A letra <i>a</i> indica ausência de diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.....	84
<b>Tabela 3.31</b> - Média da $F_v/F_m$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da $F_v/F_m$ para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.....	85
<b>Tabela 3.32</b> - Média da $F_v/F_m'$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da $F_v/F_m'$ para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.....	86
<b>Tabela 3.33</b> - Média da $\phi_e$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da $\phi_e$ para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.....	87
<b>Tabela 3.34</b> - Média da ETR, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da ETR para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a, b, c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.....	88
<b>Tabela 3.35</b> - Média da $Y_{(NPQ)}$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da $Y_{(NPQ)}$ para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a, b, c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.....	89
<b>Tabela 3.36</b> - Média da $Y_{(NO)}$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da $Y_{(NO)}$ para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.....	90
<b>Tabela 3.37</b> - Média da NPQ, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da NPQ para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.....	91
<b>Tabela 3.38</b> - Média da $q_p$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da $q_p$ para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a, b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r, s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.....	92

<b>Tabela 3.39</b> - Média da $q_L$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da $q_L$ para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras <i>r</i> , <i>s</i> indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.....	93
<b>Tabela 3.40</b> - Média da percentagem dos ácidos gordos mais abundantes ( $> 0,5 \%$ ), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ), para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo.....	103
<b>Tabela 3.41</b> - Média da percentagem dos ácidos gordos menos representativos ( $< 1 \%$ ), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo.....	105
<b>Tabela 3.42</b> - Média do teor de glúcidos no grão ( $\text{mg } 100 \text{ mg}^{-1} \text{ peso seco}$ ), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ), para cada tratamento. A letra <i>a</i> indica que não existem diferenças significativas entre os tratamentos para cada glícido.....	107
<b>Tabela 3.43</b> - Média do teor de glúcidos no grão ( $\mu\text{g } 100 \text{ mg}^{-1} \text{ peso seco}$ ), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) para cada tratamento. A letra <i>a</i> indica que não existem diferenças significativas entre os tratamentos para cada glícido.....	107
<b>Tabela 3.44</b> - Parâmetros colorimétricos das amostras, com a respetiva análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ), para cada tratamento. Os valores apresentados correspondem à média dos parâmetros colorimétricos e respetivo erro padrão. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada parâmetro colorimétrico..	114
<b>Tabela 3.45</b> - Média da concentração de micronutrientes no grão ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ peso seco}$ ), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) para cada concentração. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada elemento mineral.....	116
<b>Tabela 3.46</b> - Média da concentração de macronutrientes no grão ( $\% \text{ peso seco}$ ), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada elemento mineral.....	118
<b>Tabela 3.47</b> - Média da percentagem dos ácidos gordos mais abundantes ( $> 0,5 \%$ ), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo..	120
<b>Tabela 3.48</b> - Média da percentagem dos ácidos gordos menos representativos ( $< 1 \%$ ), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo.....	121
<b>Tabela 3.49</b> - Média do teor de glúcidos no grão ( $\text{mg } 100 \text{ mg}^{-1} \text{ peso seco}$ ), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada glícido.....	122
<b>Tabela 3.50</b> - Parâmetros colorimétricos das amostras, com a respetiva análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ), para cada tratamento. Os valores apresentados correspondem à média dos parâmetros colorimétricos e respetivo erro padrão. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada parâmetro colorimétrico..	126
<b>Tabela 3.51</b> - Média da concentração de micronutrientes no grão ( $\text{mg kg}^{-1} \text{ peso seco}$ ), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> , <i>e</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada elemento mineral.....	128

<b>Tabela 3.52</b> - Média da concentração de macronutrientes no grão (% peso seco), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada elemento mineral.....	130
<b>Tabela 3.53</b> - Média da percentagem dos ácidos gordos mais abundantes (> 0,5 %), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) da percentagem dos ácidos gordos mais abundantes para cada concentração referente à última colheita. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo....	132
<b>Tabela 3.54</b> - Média da percentagem dos ácidos gordos menos representativos (< 1 %), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo.....	133
<b>Tabela 3.55</b> - Média do teor de glícidos no grão (mg 100 mg <sup>-1</sup> peso seco), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %) para cada tratamento. As letras <i>a</i> , <i>b</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada glícido.....	135
<b>Tabela 3.56</b> - Parâmetros colorimétricos das amostras, com a respetiva análise de variância ( $\alpha = 0,05$ %), para cada tratamento. Os valores apresentados correspondem à média dos parâmetros colorimétricos e respetivo erro padrão. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada parâmetro colorimétrico.	142



## Introdução

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) estima que até 2050 a população mundial chegará a 9,1 mil milhões. Para alimentar essa população, a produção de alimentos deve aumentar em 70 % (FAO, 2009). No entanto, as culturas alimentares de primeira necessidade contêm níveis reduzidos de micronutrientes, podendo tornar-se insuficientes para fazer face aos requisitos mínimos diários (Carvalho e Vasconcelos, 2013).

As deficiências nutricionais constituem um grave problema de saúde pública, afetando mais de metade da população mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento, devido à crescente população, indisponibilidade de recursos e falta de legislação e controlo governamental. Deficiências de ferro, zinco, iodo, selénio, vitamina A e ácido fólico afetam cerca de 30 % da população mundial. Estas deficiências conduzem ao baixo peso, responsável por 3,7 milhões de mortes por ano, e a anemias associadas a cerca de 861 mil mortes (Akhtar *et al.*, 2011). No caso da anemia apontam-se consequências, incluindo reduzido desenvolvimento psicomotor e mental em crianças, parto prematuro e diminuição da função imunológica (Welch e Graham, 2005; Bouis e Welch, 2010; Akhtar *et al.*, 2011). Um estudo (Haidar, 2010) realizado entre as mulheres etíopes, indica que o ferro e o ácido fólico constituem deficiências nutricionais relevantes, a par de deficiências múltiplas em micronutrientes.

O consumo reduzido de carne e produtos cárneos parece ser uma das razões que contribui para a prevalência destas deficiências nutricionais nos países em desenvolvimento. As crianças e mulheres em idade fértil parecem ser o segmento mais vulnerável (Martínez-Navarrete *et al.*, 2002; Akhtar *et al.*, 2011).

É neste contexto que surge o nosso estudo. Entre as várias estratégias para controlar a deficiência de micronutrientes, a biofortificação de alimentos base parece ser um dos métodos mais viáveis. Este é um processo ligado ao desenvolvimento de culturas naturalmente enriquecidas em micronutrientes, que pode constituir uma estratégia de intervenção para corrigir deficiências nutricionais no ser humano. Algumas vantagens desta estratégia, quando comparada com os sistemas de suplementação na alimentação são: baixos custos de produção; maior cobertura populacional; melhor abordagem profilática a longo prazo. Contudo, não se espera que a biofortificação agronómica atenuie a deficiência de micronutrientes em todos os grupos populacionais. Esta estratégia pretende complementar outras intervenções, proporcionando, de uma forma económica e eficaz, micronutrientes, de forma sustentável, aos grupos mais vulneráveis (Akhtar *et al.*, 2011; Saltzman *et al.*, 2013).

Os cereais são considerados a matriz nutricional mais adequada para a biofortificação em países em vias de desenvolvimento, dado que 95 % da população consome cereais e

produtos derivados. Estes são relativamente baratos, cultivados e consumidos por todas as classes económicas. A farinha de trigo é um alimento básico da população que fornece mais de 50 % do consumo total de energia. Diversos países no Médio Oriente e Norte de África implementaram Programas de biofortificação de trigo com ferro e outros micronutrientes (Akhtar *et al.*, 2011).

Esta perspetiva conduziu, a nível mundial, ao desenvolvimento de Programas de biofortificação da farinha de trigo, que aumentaram de 18 % (em 2004) para 27 % (em 2007). O número estimado de pessoas com acesso a farinha de trigo biofortificada aumentou em cerca de 540 milhões e o número anual de recém-nascidos cujas mães tiveram acesso a farinha de trigo biofortificada durante a gravidez aumentou em cerca de 14 milhões. Apesar destes progressos, mais de dois terços da população mundial ainda não tem acesso a farinha de trigo biofortificada, incluindo milhões de mulheres em idade fértil (Akhtar *et al.*, 2011).

Este projeto de investigação tem assim como principal objetivo desenvolver um itinerário técnico para a biofortificação de trigo duro (*Triticum durum* cv. Marialva) em micro e macronutrientes. Adicionalmente, pretende-se uma caracterização nutricional e tecnológica, destacando-se a/o:

- a) Aferição, a par da localização nos tecidos, da cinética de absorção radicular, translocação para a parte aérea e deposição no grão de micro e macro elementos;
- b) Quantificação da taxa de produção / mobilização de fotoassimilados para o grão;
- c) Estudo da concentração ideal de nutrientes, com destaque para o ferro, para biofortificação, considerando a transformação da semente em sêmola;
- d) Caracterização das propriedades físicas, químicas e tecnológicas da sêmola biofortificada;
- e) Determinação da qualidade nutricional da semente e da sêmola biofortificada em sistema industrial, adotando-se o modelo *scale up*.





## **I – Revisão Bibliográfica**

---

## Capítulo I – Revisão Bibliográfica

O trigo constitui uma fonte de calorias e proteínas relevante na maior parte dos países a nível mundial. Neste contexto, o incremento da segurança alimentar das populações passará por padrões de qualidade mais elevados e adequados às necessidades da indústria.

Atualmente, o trigo continua a ser um cereal importante para os sistemas tradicionais de agricultura do Sul de Portugal, onde se torna difícil encontrar outras alternativas viáveis. Nas últimas décadas, registou-se em Portugal uma maior tendência para a cultura do trigo mole (*Triticum aestivum*), representando o trigo duro (*Triticum durum*) cerca de 10 % da produção total nacional (Bagulho *et al.*, 1994).

### 1.1- Produção e consumo mundial

Estima-se que os primeiros grãos de cereais foram domesticados há cerca de 10.000 - 12.000 anos por comunidades agrícolas antigas na região do Crescente Fértil do Médio Oriente, na América Central e no sul da China (Lev-Yadun *et al.*, 2000). As primeiras formas de cultivo de trigo foram essencialmente variedades locais de populações selvagens selecionadas pelos agricultores (Shewry, 2009).

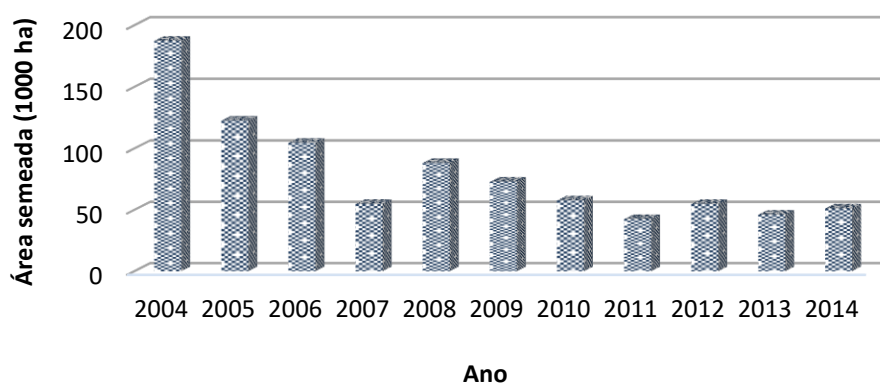
O cultivo de trigo propagou-se em todas as direções, mas a bacia do Mediterrâneo desempenhou um papel fundamental na sua diferenciação, em particular no trigo duro (Nuñez, 2003; Marti e Slafer, 2014). Na Península Ibérica, o cultivo de trigo foi datado, pelo menos há 4.000 anos (López Bellido, 1991).

A produção de trigo duro atinge cerca de 30 milhões de toneladas em cerca de 16 milhões de hectares. As áreas de produção de trigo duro estão concentradas no Médio Oriente, Norte de África, América do Norte, Índia Central e Europa Mediterrânica. A região do Mediterrâneo produz cerca de 60 % da produção mundial de trigo duro, sendo a União Europeia (com destaque para Itália, Espanha, França e Grécia) o principal produtor mundial (Morancho, 2000). No entanto, esta produção de trigo duro representa apenas 8 % da produção mundial de trigo (Manzano, 2007; Pinheiro *et al.*, 2013). Apesar da sua reduzida área de produção, esta é uma cultura economicamente importante devido às suas características únicas e produtos finais. Este é geralmente considerado o mais tolerante de todos os trigos. O seu teor em proteína e glúten tornam-no adequado para o fabrico de diversos produtos alimentares, nomeadamente massas alimentícias, produto bastante consumido na Europa e América do Norte (Roncallo *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2013).

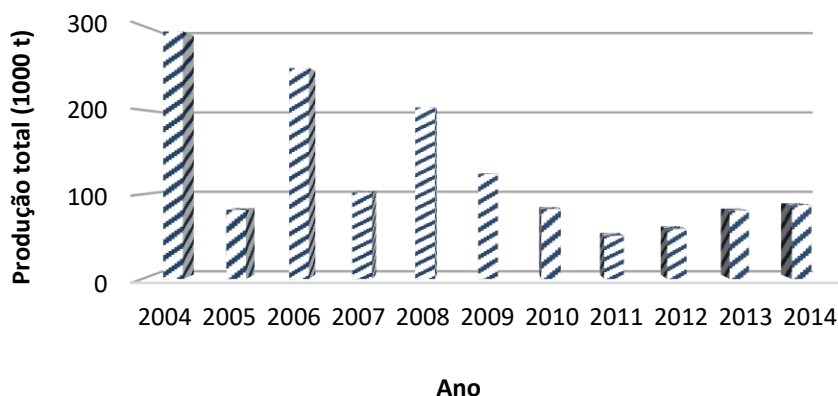
A Itália encontra-se na primeira posição de consumo de massas alimentícias por habitante / ano a nível mundial, com um consumo médio de 28 kg por habitante / ano, seguindo-se os Estados Unidos da América, Chile, Grécia, Venezuela, Tunísia, Suíça, Peru e

por fim, a França, Rússia e Argentina com um consumo médio de 9 kg por habitante / ano (Roncallo *et al.*, 2009).

De acordo com os dados do Eurostat, a produção de cereais de Outono / Inverno atingiu em 2011 um mínimo bastante acentuado, apenas superado pela campanha de 2004, fortemente marcada pela seca (Figuras 1.1 e 1.2). No ano agrícola 2010 / 2011 as condições meteorológicas adversas, que conduziram ao encharcamento dos terrenos, não permitiram a realização das sementeiras, contribuindo desta forma para quebras generalizadas nas áreas semeadas, em particular de trigo duro (69 %) e trigo mole (18 %). A partir do ano agrícola mencionado a produção total de trigo sofreu um incremento considerável.



**Figura 1.1** - Evolução da superfície cultivada com trigo em Portugal. (Fonte: Eurostat, 2015)



**Figura 1.2** - Evolução da produção total de trigo em Portugal. (Fonte: Eurostat, 2015)

## 1.2- Caracterização do grão de trigo

O grão de trigo apresenta geralmente forma oval, embora diferentes espécies e / ou variedades tenham grãos com forma ligeiramente diferente. O grão varia entre 5 - 9 mm de comprimento, com um peso oscilando entre 35 - 50 mg (Sramková *et al.*, 2009).

De forma generalizada, o grão de trigo é um fruto que contém cerca de 12 - 18 % de pericarpo, 80 - 85 % de endosperma e 2 - 3 % de gérmen. A farinha de trigo é obtida a partir do endosperma depois de separado dos restantes componentes durante o processo de moagem. O pericarpo contém diversos componentes, nomeadamente compostos fenólicos, amido, fibra dietética solúvel e insolúvel, proteínas e teor mineral (Xie *et al.*, 2008). A tabela 1.1 apresenta os teores de ferro, no grão de trigo duro, determinados por vários autores.

Do ponto de vista estrutural, as células do endosperma contém paredes celulares, grânulos de amido, matriz e corpos proteicos. As paredes celulares possuem um elevado teor de fibra (celulose,  $\beta$ -glucanas e pentosanas) e encerram os restantes constituintes. Os grânulos de amido ocupam a maior parte do espaço celular, estando rodeados pela matriz proteica e pelos corpos proteicos (Bagulho, 2008).

As células do endosperma fornecem as reservas necessárias ao desenvolvimento da semente durante a germinação do embrião, particularmente os glícidos (com destaque para o amido), proteínas, lípidos e elementos minerais. As proteínas e o amido têm sido amplamente estudados, não só por serem os componentes mais abundantes do endosperma, mas também por serem os principais responsáveis pelas propriedades tecnológicas e funcionais das farinhas (Bagulho, 2008).

**Tabela 1.1** - Concentração de ferro no grão de trigo duro.

Concentração de ferro (mg kg <sup>-1</sup> )	Referências
39,9 - 42,5	Narwal et al. (2012)
46,6	Ficco et al. (2009)
30 - 73	Cakmak et al. (2004)
23 - 52	Velu et al. (2011)
25,6 - 34,5	Zhang et al. (2010)
37,7 - 47,8	Gao et al. (2012)

No trigo distinguem-se duas classes de dureza do grão, de acordo com a espécie cultivada: trigo mole (*Triticum aestivum*) e trigo duro (*Triticum durum*) (Figura 1.3). As designações de mole e duro devem-se à textura da semente, que está relacionada com a associação entre os grânulos de amido e a matriz proteica (Barlow *et al.*, 1973). O trigo duro requer mais força para se desintegrar comparativamente ao trigo mole, originando produtos

com partículas maiores, as sêmolas. Devido à sua textura elevada, a técnica usada na moenda do trigo duro apresenta bastante influência no teor de amido danificado e nas propriedades reológicas. De uma forma generalizada, o trigo mole contém menos proteína bruta que o trigo duro mas maior teor de amido (Rosenfelder *et al.*, 2013).



**Figura 1.3** - Espiga de trigo mole (à esquerda) e de trigo duro (à direita).

O trigo duro é uma das principais culturas de cereais na região do Mediterrâneo, sendo utilizado fundamentalmente na produção de massas alimentícias. A sua cor resulta dos pigmentos naturais presentes na sêmola, do teor residual após o armazenamento e do processo de moagem (Simone *et al.*, 2010; Meziani *et al.*, 2012). A qualidade do trigo duro está dependente de fatores como a fertilidade do solo, adubação e disponibilidade de água (Pinheiro *et al.*, 2013). Vários estudos (Rharrabti *et al.*, 2003; Kilic *et al.*, 2005; Mohammadi *et al.*, 2011) demonstraram que as condições ambientais apresentam uma influência significativa sobre as características de qualidade do trigo, particularmente no teor de proteína e no índice de glúten.

### **1.3- Importância do trigo duro**

O trigo duro, o mais tolerante de todas as espécies de trigo, adapta-se a climas semiáridos, apresentando uma vantagem adaptativa comparativamente com o trigo mole (face a temperatura elevada e secura ambiental). Dias quentes e noites frias favorecem o desenvolvimento de grãos vítreos desejáveis para uma vasta variedade de produtos alimentares processados, incluindo os *couscous*, o *bulghur* e massas alimentícias, o produto final mais comum nas economias de mercado desenvolvidas. A produção tradicional predomina em regiões quentes e secas do Crescente Fértil, regiões mediterrânicas da África do Norte e Sul

da Europa para além de outras áreas produtivas atrás citadas. Com base em dados de 21 países produtores de trigo duro, verificou-se que a sua produção mundial aumentou em média 2,6 %, de 26,8 em 1994 - 1999 para 27,6 milhões de toneladas durante o período de 2000 - 2005 (Cakmak *et al.*, 2010c).

No entanto, estas estatísticas, não refletem a importância do trigo duro em particular nos países em desenvolvimento, devido à ausência de dados compilados pela indústria do trigo. O desenvolvimento de estatísticas fiáveis é ainda mais complexo quando se equacionam estatísticas agrícolas. A Etiópia, um centro de diversidade para o trigo, pode servir como exemplo de um país onde o trigo duro é o principal alimento em diversas regiões e que não está incluído nas estatísticas (Cakmak *et al.*, 2010c).

O trigo duro nos países em desenvolvimento é frequentemente cultivado sob condições propensas à seca e até mesmo marginais. Esses ambientes vulneráveis são frequentemente sujeitos a uma elevada variabilidade de produção devido à variação anual da precipitação. O trigo contribui com mais de 50 % para o consumo diário de energia, comparativamente com uma média de 20 % numa escala global (Cakmak *et al.*, 2010c).

O trigo é uma das três principais culturas de cereais a nível mundial e representa uma fonte alimentar de calorias, proteínas e micronutrientes para a maioria da população mundial, particularmente nos países em desenvolvimento. É responsável por 70 % da ingestão diária de calorias da população que vive em zonas rurais e uma importante fonte de zinco. China, Índia, México, Paquistão e Turquia são alguns dos principais países produtores de trigo e responsáveis por mais de 30 % da produção mundial. Estes países estão também entre as regiões onde a deficiência de zinco é mais acentuada em solos, culturas e população humana (Zou *et al.*, 2012).

#### **1.4- Estratégias de biofortificação**

A acumulação de micronutrientes, a nível tecidual, depende de mecanismos homeostáticos, estritamente controlados, que regulam a absorção, translocação e redistribuição de metais nas plantas (Bouis e Welch, 2010).

A primeira barreira para a absorção de micronutrientes reside na interface solo - raiz. De forma a aumentar a absorção de micronutrientes através das raízes, os níveis disponíveis de micronutrientes na rizosfera devem ser incrementados. A absorção de micronutrientes pode ser melhorada através da alteração da morfologia da raiz ou alterando a solubilidade de elementos metálicos (Welch e Graham, 2005; Velu *et al.*, 2014). Por conseguinte, os mecanismos de absorção devem ser suficientemente ativos e específicos para permitir a acumulação de micronutrientes, uma vez que entram no apoplasto de células da raiz. Uma vez absorvidos pelas células da raiz, os micronutrientes devem ser eficientemente translocados

e acumulados nos órgãos da planta. Por fim, os micronutrientes acumulados devem ser preferencialmente armazenados de uma forma que os torne biodisponíveis para o aparelho digestivo humano (Welch e Graham, 2005; Sperotto *et al.*, 2012; White, 2012).

Testar a taxa de assimilação de nutrientes, através da utilização de *caco cells* de forma a simular a absorção na mucosa intestinal humana, é atualmente um modelo em estudo. No entanto é razoável assumir que os dados obtidos para a biodisponibilidade de ferro irão refletir níveis de zinco biodisponíveis em genótipos promissores, visto que a esmagadora maioria dos fatores que inibem ou promovem a biodisponibilidade de ferro, também inibem ou promovem a biodisponibilidade de zinco (Welch e Graham, 2005; DellaValle *et al.*, 2013). Um ensaio realizado (Rosado *et al.*, 2009) em mulheres mexicanas adultas, no sentido de determinar a biodisponibilidade de ferro em trigo biofortificado evidenciou que a absorção de ferro foi maior a partir do trigo biofortificado face ao controlo. Uma consideração importante prende-se com a correlação negativa entre o fósforo e o ferro. Aproximadamente 75 % do total de fósforo no grão de trigo é armazenado na forma de ácido fítico, particularmente no gérmen e aleurona. Neste contexto, melhorar a biodisponibilidade de ferro deverá ser mais fácil do que aumentar a sua concentração em grãos (Bohn *et al.*, 2008; Velu *et al.*, 2014).

O incremento dos níveis dos diferentes elementos minerais pode ser conseguido por meio de suplementação ou fortificação agronómica (Bouis e Welch, 2010). No entanto, a suplementação é um processo dispendioso e de difícil aplicação, particularmente em áreas rurais (Cakmak *et al.*, 2004). O enriquecimento de culturas através de variação genética, tendo como objetivo o melhoramento tradicional designa-se por biofortificação (Cakmak *et al.*, 2004; Welch e Graham, 2004; Cakmak, 2008; Bouis e Welch, 2010; Velu *et al.*, 2014). Contudo, o sucesso da biofortificação depende da capacidade em aumentar os micronutrientes em plantas e também da sua biodisponibilidade no organismo humano (White e Broadley, 2009; Bouis e Welch, 2010).

Algumas das estratégias de biofortificação podem ser adquiridas por fertilização, melhoramento convencional e / ou engenharia genética. A adubação mineral pode tornar-se problemática devido ao custo (minerais dispendiosos que devem ser aplicados regularmente) e devido a questões ambientais. A fertilização em ferro torna-se um processo complexo, visto que este elemento apresenta uma forte tendência para a insolubilidade. Outra estratégia consiste na aplicação foliar, processo que melhora a produtividade das plantas cultivadas em solos deficientes em ferro e incrementa as concentrações finais das culturas (Sperotto *et al.*, 2012; Carvalho e Vasconcelos, 2013). Narwal *et al.* (2012) evidenciam que as aplicações foliares de ferro desempenham um papel fundamental no incremento dos teores deste mineral no grão. Diversos estudos (Cakmak, 2010; Yadav *et al.*, 2011; Khoshgoftarmanesh *et al.*, 2012) também indicam que fertilizantes de ferro aplicados na forma inorgânica (FeSO<sub>4</sub>) ou na forma de quelatos (Fe-EDTA, Fe-EDDHA) no solo e através de aplicação foliar não foram



eficazes no incremento da concentração de ferro em grãos de trigo. Estes autores demonstraram que entre os fertilizantes aplicados, o Fe-EDTA parece constituir a melhor fonte de ferro.

Estudos de Kutman *et al.* (2010), Aciksoz *et al.* (2011) e Erenoglu *et al.* (2011) também revelam que o azoto pode influenciar direta ou indiretamente a absorção radicular e translocação de micronutrientes. A estratégia de aplicação foliar de azoto mostrou ser bastante eficaz na melhoria da absorção radicular e parte aérea, assim como na acumulação de ferro no grão. Observaram-se correlações negativas entre o conteúdo de glutenina e as concentrações de ferro e zinco e correlações negativas fortes entre o ferro e a altura da planta e o conteúdo de glutenina. Estes resultados indicaram que as plantas mais pequenas e com menor teor de glutenina tendem a apresentar uma maior acumulação de ferro no grão (Velu *et al.*, 2014).

De acordo com Graham *et al.* (2007), a concentração de ferro no grão deverá ser aumentada em 25 mg kg<sup>-1</sup>, de forma a adquirir um impacto biológico mensurável sobre a saúde humana. Assim, as metas de biofortificação de ferro no grão de trigo são de 60 mg kg<sup>-1</sup>, assumindo concentrações médias atuais de ferro de 35 mg kg<sup>-1</sup>. Estudos realizados em ensaios de campo demonstraram que a concentração de ferro no grão de trigo variou entre 15 - 109 mg kg<sup>-1</sup>, com uma média de 46 mg kg<sup>-1</sup> (Cakmak *et al.*, 2004).

Zhang *et al.* (2010) constataram um incremento de zinco de 26 - 48 % na sêmola e 24 - 58 % no pericarpo. No entanto, embora seja possível incrementar os níveis de zinco no grão por aplicação de fertilizantes, a maior parte deste encontra-se no pericarpo, sendo portanto perdido durante a moagem. Neste contexto, torna-se importante avaliar diferentes processos de moagem para encontrar o método que proporcione o menor número de perdas nutricionais (Cakmak *et al.*, 2004; Hussain *et al.*, 2010).

Rosado *et al.* (2005) demonstraram que a farinha biofortificada em ferro revela uma ótima estabilidade quando armazenada à temperatura ambiente. Estes autores mencionaram a retenção de 95 % de ferro, após 90 dias de armazenamento, tendo ainda sugerido que o ferro elementar será o mais indicado para a biofortificação de cereais e farinhas, devido à sua baixa reatividade e insolubilidade em água (Akhtar *et al.*, 2011).

Alterações na absorção da água, tempo de desenvolvimento e estabilidade da massa, em função da biofortificação mineral com diferentes tratamentos (por kg de farinha - 60 mg NaFeEDTA, 30 mg ZnSO<sub>4</sub>, 40 mg NaFeEDTA mais 20 mg ZnO, 40 mg de ferro elementar mais 30 mg ZnSO<sub>4</sub> e 40 mg de ferro elementar mais 20 mg ZnO) foram ainda estudados por Akhtar *et al.* (2009), não tendo verificado alterações significativas nas características reológicas da massa.

Desenvolver plantas que de uma forma eficiente mobilizam o ferro e prosperam em solos com disponibilidade limitada deste elemento, acumulando-o nas partes comestíveis, torna-se um processo relevante no âmbito da biofortificação agronómica. Sendo o trigo um

cereal particularmente importante no processo de biofortificação, e considerando que o grão contem níveis reduzidos de micronutrientes (nomeadamente ferro), um pequeno incremento nos respetivos teores no grão poderá ter um impacto significativo na saúde humana, sobretudo nos países em desenvolvimento (Sperotto *et al.*, 2012).

### **1.5- Processamento industrial de trigo duro**

Uma massa de qualidade requer matéria-prima de qualidade (Toussaint-Samat, 1992). Na limpeza dos grãos, verifica-se a presença ou não de substâncias estranhas através de equipamentos que as separam por tamanho, peso específico e forma. Procede-se ao condicionamento para que os grãos atinjam o teor de humidade ideal para a máxima extração da farinha, seguido da moagem propriamente dita e, por fim, da classificação, processo realizado por peneiras, permitindo obter as farinhas desejadas (Amorim, 2007).

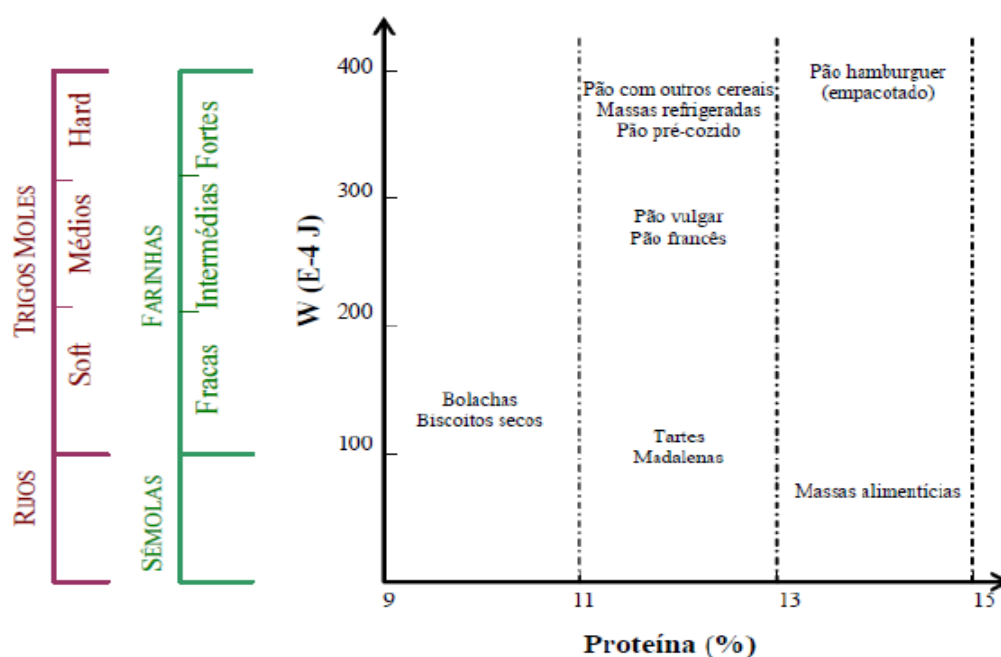
O processo de moagem para obtenção da farinha de trigo branca consiste na redução do endosperma a farinha, precedido da separação do pericarpo e do gérmen, com a finalidade de elaborar produtos de maior qualidade. O gérmen é separado de forma a reduzir o conteúdo de lípidos, atenuando assim a rancificação da farinha e preservando as suas características durante o armazenamento. A camada externa do grão (pericarpo) é também retirada, de modo a tornar a farinha mais clara, permitindo reduzir o teor de fibras e melhorar as características tecnológicas (Castelo *et al.*, 1998; Feillet *et al.*, 2000). A forma e textura do grão e as condições técnicas de moagem, principalmente a taxa de extração, são importantes para determinar a extensão da perda de mineral (Cubadda *et al.*, 2009).

Da moagem do trigo duro obtém-se principalmente sêmola, através da mistura e extrusão da sêmola com água, maioritariamente utilizada no fabrico de massas alimentícias de elevada qualidade devido à sua cor original, sabor, baixa atividade de lipoxigenase, elevado teor de proteína, qualidade de cozedura e pelo facto de preservar durante bastante tempo as suas qualidades e valor nutricional (Figura 1.4) (Aalami *et al.*, 2007).

Adicionalmente existem outros produtos derivados do trigo duro como os *couscous*, o *bulghur* e o *frekeh*, bastante consumidos em países mediterrânicos do Norte de África e Médio Oriente (Elias, 1995; Carrillo *et al.*, 2006).

Os parâmetros de processamento utilizados para fabricar as massas, tais como as condições de secagem e de extrusão, podem alterar a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua velocidade de digestão (Aravind *et al.*, 2011). A secagem é uma etapa crítica na definição das características finais das massas, particularmente ao nível da modificação dos seus componentes principais. Os métodos de secagem tradicionais envolvem baixas temperaturas entre 29 - 40 °C e tratamentos de longo prazo entre 24 - 60 h. A aplicação de temperaturas

elevadas entre 75 - 100 °C ou muito elevadas, superiores a 100 °C e tratamentos de curta duração (5 - 12 h ou 1 - 2 h) têm sido amplamente adotados na produção industrial. Através da aplicação de tratamentos rápidos e com elevadas temperaturas é possível obter uma melhoria nas propriedades de cozedura das massas, aumento da produtividade e redução da contaminação microbiana. Durante esta etapa mais de 50 % do total de água na massa é removida e o teor de humidade atinge valores de 12 - 13 % (Giannetti *et al.*, 2014).



**Figura 1.4** - Diversidade de produtos alimentares obtidos a partir do trigo (Brites, 2000).

A monitorização da fração volátil, que contribui para a definição do sabor, pode ser relevante para caracterizar diferentes massas. Alguns estudos (Beleggia *et al.*, 2009; Giannetti *et al.*, 2014) demonstraram que a sêmola de trigo duro liberta compostos voláteis que, dependendo da cultivar de trigo, influenciam o aroma do produto transformado. Uma vez que a massa pode ser produzida através de diferentes processos de secagem, as condições de operação devem ser definidas de forma a melhorar o aroma final, reter e incrementar o sabor típico do trigo duro (Giannetti *et al.*, 2014).

Os atributos de qualidade das massas são influenciados principalmente pelas propriedades das proteínas, fração de amido e ainda outros fatores, nomeadamente a origem da sêmola e as condições de processamento (Maache-Rezzoug e Allaf, 2005). A qualidade deste produto é geralmente avaliada através de parâmetros tecnológicos, tais como o índice colorimétrico, o teor de proteína, a acumulação de elementos minerais (particularmente importante quando existe um limite legal do teor de cinzas no produto extraído), vitreosidade,

teor de glúten, índice de humidade (que condiciona o processo de armazenamento do trigo e o seu condicionamento para a moagem), índice de sedimentação SDS, peso de mil grãos, ou propriedades que influenciam as preferências dos consumidores, como o grau de firmeza e rigidez (Migliori *et al.*, 2005; Giannetti *et al.*, 2014).

No caso de produtos de qualidade, o teor de proteína deve estar compreendido entre 12 - 16 %. A vitreosidade é uma característica de qualidade relevante para a indústria das massas, uma vez que está associada ao valor comercial, sendo responsável pelo elevado rendimento da sêmola, boa granulação e pureza. O valor mínimo aceitável para este parâmetro é de 80 %. O teor de cinzas deve ser inferior a 1,8 % e o teor de glúten superior a 40 %. Quanto ao índice de sedimentação SDS, considera-se um valor superior a 50 mm para o trigo duro e, relativamente ao índice de humidade, um valor inferior a 12 % (Pinheiro *et al.*, 2013).

A reologia da massa assume um forte impacto no processamento e qualidade dos produtos finais, pelo que os testes reológicos têm alcançado uma crescente importância. Estes testes estudam o comportamento viscoelástico (força e extensibilidade) da massa durante a sua formação e desenvolvimento ao longo da mistura com a água, e também a sua elasticidade e firmeza (Bagulho, 2008).

## **1.6- Absorção de elementos minerais em animais**

A farinha de trigo biofortificada em ferro e zinco facilita a absorção destes elementos químicos na mucosa intestinal (Khoshgoftarmansh *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2012), no entanto algumas interações entre os minerais podem alterar a sua biodisponibilidade (Ahmed *et al.*, 2012). Neste contexto, desenvolveu-se um estudo para medir a biodisponibilidade e a extensão da interação entre minerais, tais como, cálcio, ferro e zinco obtidos a partir de 72 % de extração de farinha de trigo biofortificada, utilizando o modelo animal. Os autores (Ahmed *et al.*, 2012) constataram que a dieta com zinco, em combinação com o cálcio ou o ferro, demonstrou uma menor retenção de zinco no plasma e no fígado de ratos, do que a dieta contendo apenas zinco que apresentou maiores níveis de zinco no plasma e no fígado. Estes dados podem explicar-se considerando interações antagonistas de Ca e Zn, sugerindo que o incremento de cálcio na dieta contribui para uma menor absorção de zinco. A absorção de zinco depende ainda da matriz alimentar. O ácido tânico ou alguns compostos polifenólicos de bebidas, tais como, chá ou sumos de uva aumentam a absorção de zinco nas *caco cells* (Sreenivasulu *et al.*, 2008).

Considerando a relevância destes elementos minerais também para o organismo humano segue-se uma abordagem descritiva dos principais micro e macro elementos.

**a) Ferro**

O ferro é um elemento químico essencial, envolvido numa vasta gama de processos biológicos fundamentais, tais como replicação e reparação do ADN, controlo do ciclo celular e metabolismo energético mitocondrial. No entanto, o excesso de ferro tem o potencial de induzir efeitos adversos na saúde humana, devido à sua capacidade de ganhar e perder eletrões (Guo *et al.*, 2015). A hemocromatose idiopática é uma alteração do metabolismo do ferro caracterizada pela absorção de elevados níveis de ferro na presença de elevadas reservas deste elemento. Mais de 50 % dos pacientes com esta doença apresentam diabetes. A cirrose hepática e a artrite são também patologias comuns, enquanto doenças cardíacas e carcinomas constituem complicações tardias (Crawford, 1995).

A deficiência de ferro, conforme já referido, é uma condição comum e difundida em todo o mundo constituindo um problema de saúde pública, sobretudo nos países em desenvolvimento. Adicionalmente, considera-se ser uma das formas mais predominantes de desnutrição. Em particular, surge quando as reservas de ferro no organismo se esgotam ou quando a ingestão de ferro não satisfaz as necessidades fisiológicas, provocando alterações ao nível do desenvolvimento cognitivo, função imunológica, metabolismo energético ou regulação da temperatura (Enko *et al.*, 2015).

**b) Cobre**

O ião cobre é o terceiro metal de transição mais abundante no corpo humano sendo essencial para os processos fisiológicos do organismo (Zhang *et al.*, 2015). A exposição de longo prazo ao cobre pode irritar as narinas, boca, olhos, causando enxaquecas, náusea e diarreia. A ingestão de água com concentrações elevadas de cobre pode provocar vômitos, náusea e diarreia também. A ingestão de concentrações elevadas de forma intencional pode causar falhas hepáticas e renais com consequente morte (ATSDR, 2004).

O excesso de cobre é conhecido por induzir a deficiência de iões essenciais ( $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) (Thomas *et al.*, 2013). O excesso de cobre livre está mais difundido na população humana devido ao elevado consumo de cobre inorgânico sob a forma de suplementos minerais (Pal, 2014).

**c) Manganês**

O manganês é um elemento mineral essencial para uma variedade de processos enzimáticos cerebrais, sendo importante para manter as funções celulares normais. No entanto, o excesso de manganês pode ser neurotóxico e dependendo da quantidade e duração da exposição, pode conduzir a uma variedade de problemas neurológicos. Exposições agudas elevadas ou a exposição a longo prazo a elevadas concentrações de manganês foram associadas

a uma variedade de défices de função motora incluindo, distonia e sinais piramidais. Défices cognitivos relacionados com a dose foram consistentemente relatados em estudos com seres humanos (Schneider *et al.*, 2015). Diversos estudos têm relatado associações entre a exposição ao manganês e problemas de desenvolvimento neurológico em crianças. Níveis elevados de manganês têm sido associados a problemas de atenção e comportamentos exteriorizados em crianças em idade escolar (Mora *et al.*, 2015).

#### **d) Zinco**

O zinco é um micronutriente essencial no que diz respeito à sua relevância em sistemas biológicos, pois é o único elemento mineral representado em todas as classes de enzimas. Uma grande diversidade de funções celulares essenciais e vias metabólicas são diretamente influenciadas pelo zinco, incluindo a estabilidade estrutural de proteínas, integridade das membranas biológicas e proteção contra espécies que reagem ao oxigénio. Cerca de 2800 proteínas em sistemas biológicos requerem zinco para a sua atividade e estabilidade estrutural (Cakmak e Hoffland, 2012).

A deficiência de zinco afeta mais de 2 mil milhões da população mundial, sobretudo grávidas e crianças. Baixa ingestão de zinco tem sido associada a problemas graves de saúde, particularmente deficiências ao nível do crescimento, sistema imunológico e capacidade de aprendizagem combinado com um risco elevado de infeções, danos ao nível do ADN e desenvolvimento de cancro (Gomez-Coronado *et al.*, 2015).

Entre as várias culturas, os cereais podem constituir uma fonte importante de zinco na dieta, estimado em cerca de 25 %. O trigo mole (*Triticum aestivum*) apresenta uma elevada relevância nas zonas mediterrânicas, sendo o cereal mais consumido nos países europeus. O grão de trigo deve conter 40 - 60 mg kg<sup>-1</sup> de zinco, contudo no sul de Portugal os teores variam entre 20 - 30 mg kg<sup>-1</sup>, devido à baixa solubilidade de zinco nos solos (Cakmak e Hoffland, 2012; Gomez-Coronado *et al.*, 2015).

#### **e) Cálcio**

O cálcio é um elemento essencial, sendo utilizado na mineralização dos ossos e dentes. O organismo humano adulto contém cerca de 1,2 kg de cálcio, sendo que 99 % encontra-se localizado nos ossos e dentes. Deficiência de longo prazo de cálcio pode conduzir ao raquitismo e má coagulação do sangue, afetando a formação óssea. Por oposição, o excesso deste elemento mineral pode causar hipercalcemia, insuficiência renal e redução da absorção de outros elementos minerais (Struminska-Parulska, 2015).

As recomendações da *Dietary Reference Intakes* (DRI) para o cálcio são: crianças 0,8 - 1,2 g; adultos 1 g; gestantes 1,2 - 1,5 g; mais de 65 anos 1,2 - 1,5 g. Diversos estudos sugeriram uma correlação entre a ingestão elevada de cálcio (2g dia<sup>-1</sup>) e o cancro da próstata. O consumo excessivo de antiácidos de carbonato de cálcio / suplementos dietéticos durante um período de semanas / meses pode causar sintomas que variam de hipercalcemia a insuficiência renal fatal (Struminska-Parulska, 2015).

#### **f) Potássio**

O potássio é um dos oito elementos minerais essenciais que o organismo humano necessita e em quantidades relativamente elevadas (100 - 1000 mg dia<sup>-1</sup>). Apesar da importância deste elemento mineral na redução do risco de doenças cardíacas e na prevenção de doenças renais, osteoporose e diabetes, a Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou uma carência a nível mundial deste mineral essencial na dieta humana (Gouiaa e Khoudi, 2015).

Entre muitos fatores, uma alimentação adequada e equilibrada com nutrientes minerais é uma questão fundamental na obtenção de uma melhor qualidade na agricultura aplicada. A escassez de potássio disponível em solos resulta numa variedade de impactos negativos, incluindo a prevenção da utilização ótima de fertilizantes de fósforo aplicados, decréscimo do rendimento dos agricultores e dos sistemas de cultivo, colocando assim em risco o futuro da segurança alimentar (Cakmak, 2010a).

#### **g) Magnésio**

Tendo em conta as suas funções específicas de proteção contra doenças cardiovasculares e diabetes, a concentração de magnésio em culturas alimentares e na dieta diária torna-se cada vez mais um problema mundial em qualidade alimentar e nutrição humana (Cakmak, 2013). A suplementação dietética de magnésio varia de forma considerável em diferentes áreas geográficas. Com efeito, em África têm sido apontados teores que variam de 188 mg dia<sup>-1</sup> em Eritreia até 1828 mg dia<sup>-1</sup> em Burkina Faso. Os cereais constituem a principal fonte de ingestão diária de magnésio (até 75 % em algumas regiões) (Cakmak, 2013).

#### **h) Fósforo**

O fósforo é um elemento nutricional essencial para todos os seres vivos e um recurso crítico para a produção agrícola. Como a maioria dos solos contem concentrações reduzidas deste nutriente, este é um componente chave da agricultura de alto rendimento (Cui *et al.*,

2015). Este elemento mineral é um dos componentes dos fosfolípidos, distribuídos nas membranas celulares, sendo o fosfato de cálcio o principal material estrutural dos ossos e dentes (Nakamura *et al.*, 2015).

Posteriormente ao cálcio, o fósforo é o elemento mais abundante no corpo humano. Aproximadamente 85 % de 600 g de fósforo no organismo encontra-se no esqueleto, enquanto os restantes 15 % encontram-se nos tecidos e no sangue, maioritariamente como fosfolípidos e ácidos nucleicos. Obviamente não existe um consenso científico de que uma ingestão adequada de fósforo é necessária para o crescimento ósseo em crianças e para a manutenção normal óssea em adultos. De facto, uma ingestão insuficiente de fósforo teria graves consequências para a estrutura óssea (Pravst, 2011).

O fósforo encontra-se naturalmente presente em diversos alimentos. Contrariamente ao cálcio, este é absorvido de forma eficiente em todos os níveis de ingestão alimentar. A ingestão média diária de fósforo nos adultos em países europeus é variável entre 1017 e 1422 mg, um nível consideravelmente superior face às recomendações atuais de 700 mg dia<sup>-1</sup> (Pravst, 2011).

Face ao exposto, e tendo em consideração a temática da presente dissertação, passa-se a apresentar a metodologia aplicada, quer em ensaios de campo, quer em ensaios laboratoriais, com vista a uma caracterização nutricional e tecnológica para o fabrico industrial de massas alimentícias.





## **II – Materiais e Métodos**

---

## Capítulo II - Materiais e Métodos

### 2.1 Material biológico

Utilizaram-se sementes de trigo duro (*Triticum durum* Desf.) da categoria “sementes certificadas”, pertencentes à variedade Marialva, inscrita no Catálogo Nacional de Variedades, fornecidas pela Estação Nacional de Melhoramento de Plantas (Elvas, Portugal), do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária.

### 2.2 Implementação das culturas

#### 2.2.1 Crescimento em ambiente controlado

Sementes certificadas de *Triticum durum* variedade Marialva foram lavadas, esterilizadas e semeadas em vaso (volume 3 L), para subsequente crescimento numa câmara de crescimento Walk in – Aralab (10.000 EHF; N° série: 1084), em condições ambientais controladas (80 % HR, 500 ppm de CO<sub>2</sub>, 22 / 18 °C dia/noite, 12 / 12 h, dia/noite, 800 µmolQ m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

O substrato utilizado possuía as seguintes características: pH 5,5 - 6,5; humidade 50 - 60 %; condutividade 0,6 - 1,2 mS cm<sup>-1</sup>; 70 % de matéria orgânica; 4,618 % Ca; 0,975 % K; 0,425 % P; 0,572 % Mg; 13,28 ppm Cu; 40,33 ppm Zn; 0,181 % Fe.

No início do ensaio semearam-se 22 vasos, cada um com 6 sementes, tendo-se no 16º dia selecionado 4 plantas por vaso. Nesta fase, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos de adubação: aplicação de 15 mL (controlo), 30 mL, 60 mL e 90 mL de uma solução nutritiva completa, utilizando-se a seguinte nomenclatura [15], [30], [60] e [90], respetivamente. No decurso do ciclo de vida das plantas procedeu-se à recolha de quatro plantas, uma por vaso, 16 (t1), 70 (t2), 92 (t3) e 126 (t4) dias após a germinação, para análises subsequentes.

A solução nutritiva completa foi efetuada da seguinte forma: inicialmente preparou-se uma solução A com 0,09 g de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (Merck 1173874; CAS: 13446-34-9), 0,12 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>.MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O (Merck 1182; CAS: 12027-67-7), 0,01 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Merck 10043353; CAS: 10043-35-3), 0,016 g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck 7446200; CAS: 7733-02-0), 0,08 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Merck 7758987; CAS: 7758-99-8), 0,16 g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich 44943; CAS: 10025-77-1) e 12,00 g de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O (Merck 902; CAS: 77-92-9). Posteriormente, esta solução foi homogeneizada com 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95 - 97 % (Merck 7664939; CAS: 7664-93-9), sob agitação numa placa (RS Lab 11 NCD). Em paralelo, procedeu-se à preparação de uma solução B (em 700 mL de água destilada, sob agitação numa placa RS Lab 11 NCD) contendo 111 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Merck 6484522; CAS: 6484-52-2), 30 g

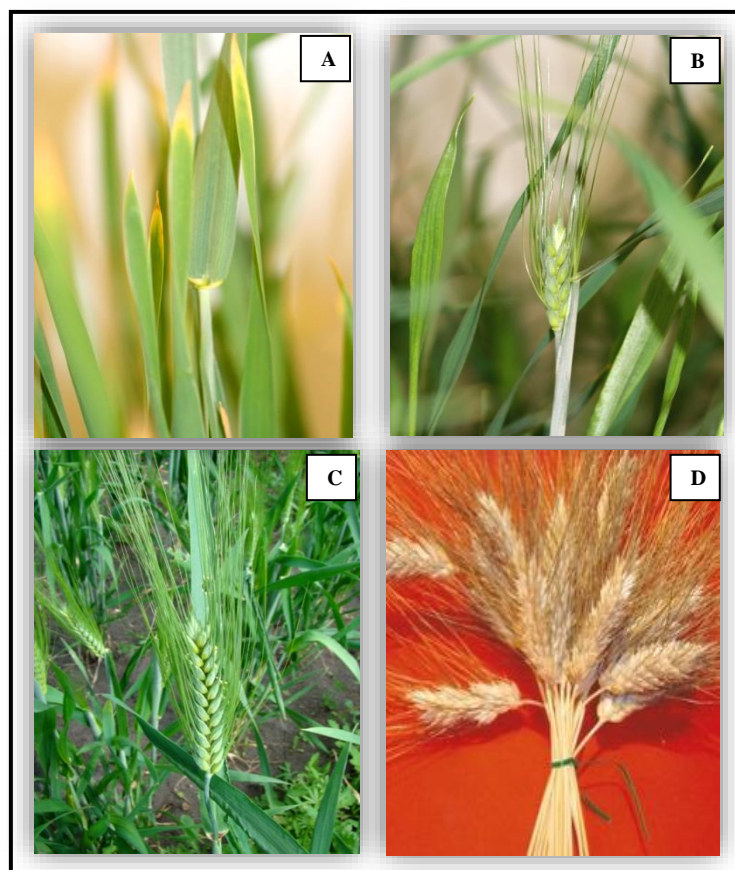
de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Panreac 122507; CAS: 10028-24-7), 65 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (Scharlau PO02871000; CAS: 7778-80-5), 17 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Scharlau CA01941000; CAS: 10035-04-8) e 4,8 g de  $\text{MgSO}_4$  (Merck 7487889; CAS: 7487-88-9). Promoveu-se a mistura das soluções A e B num balão volumétrico e completou-se o volume de 1000 mL com água destilada. Por fim, procedeu-se à diluição dos tratamentos de adubação, 15 mL (controlo), 30 mL, 60 mL e 90 mL da solução nutritiva completa em 5L de água, procedendo-se posteriormente à rega das plantas.

### 2.2.2 Crescimento em estufa

Sementes de *Triticum durum* variedade Marialva foram semeadas em vaso (volume 3 L) para subsequente crescimento em estufa, em Oeiras (latitude: 38° 41'N; longitude: 9° 18'W; altitude: 25m), entre dezembro e maio (2013 - 2014).

No início do ensaio prepararam-se 22 vasos com 6 sementes, tendo-se no 16º dia selecionado 4 plantas por vaso.

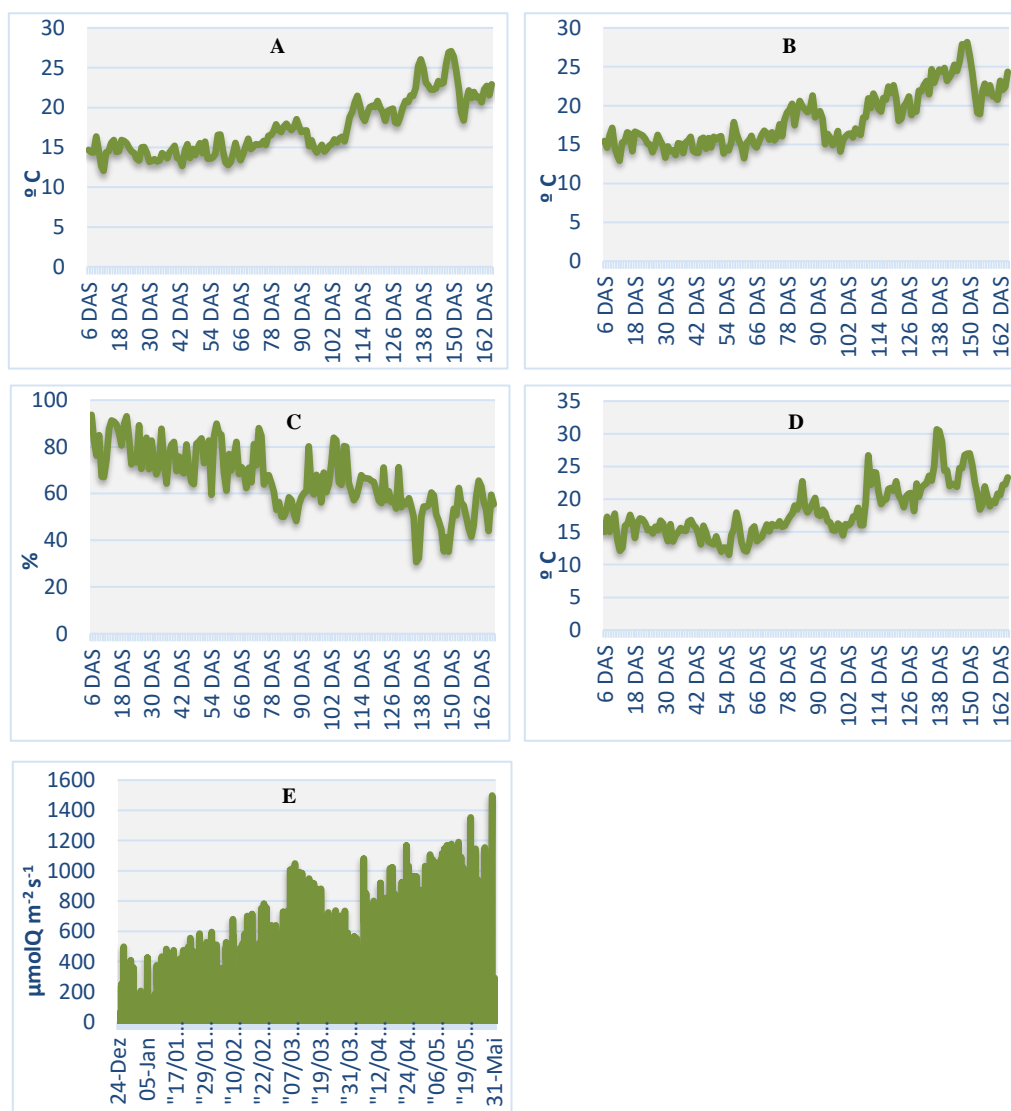
O substrato utilizado possuía as seguintes características: pH 5,5 - 6,5; humidade 50 – 60 %; condutividade 0,6 - 1,2  $\text{mS cm}^{-1}$ ; 70 % de matéria orgânica; 4,618 % Ca; 0,975 % K; 0,425 % P; 0,572 % Mg; 13,28 ppm Cu; 40,33 ppm Zn; 0,181 % Fe.



**Figura 2.1** - Aspectos do desenvolvimento das plantas da *Triticum durum*, variedade Marialva, em estufa, em diferentes estádios fenológicos: Emborrachamento (A); Espigamento (B); Ântese (C); Maturação fisiológica (D).

No decurso do ciclo de vida das plantas (150 dias), as mesmas foram submetidas aos seguintes tratamentos de adubação: aplicação de 15 mL (controlo), 30 mL, 60 mL e 90 mL de uma solução nutritiva Hoagland completa, utilizando-se a seguinte nomenclatura [15], [30], [60] e [90], respetivamente (Figura 2.1).

As condições ambientais para crescimento das plantas foram monitorizadas (Figura 2.2), utilizando-se, para aferição da temperatura do solo, 5 sensores; da temperatura do ar interior e respetiva humidade, 2 sensores (Hidroclip 2, Airchip Technology, USA); radiação fotossintética ativa (PAR), 2 sensores. Verificou-se que a temperatura do solo oscilou entre 12,1 - 27,1 °C. Na estufa observou-se uma temperatura ambiente mínima e máxima de 12,9 - 28,2 °C, respetivamente. A humidade na estufa variou entre 30,7 - 93,7 % e a temperatura exterior à estufa oscilou entre 11,5 - 30,7 °C. Quanto à radiação fotossintética ativa sofreu um incremento acentuado variável entre 0,0 - 1498  $\mu\text{mol Q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



**Figura 2.2** – Condições ambientais verificadas no ensaio em estufa entre dezembro de 2013 e maio de 2014. Temperatura do solo (A), temperatura do ar interior (B) e respetiva humidade (C), temperatura exterior (D) e radiação fotossintética ativa (E).

### 2.2.3 Crescimento em cultura de campo

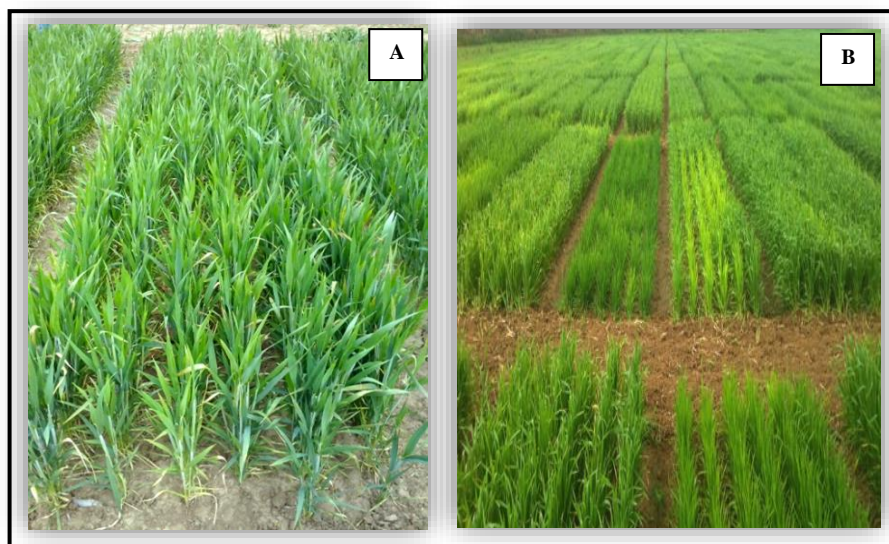
O material vegetal consistiu na variedade de *Triticum durum* (Marialva), composto pela semente controlo (*farmer seed*, também usualmente designada por “semente do agricultor”) e por grãos que foram sujeitos a diferentes concentrações de ferro quelatado com E.D.D.H.A. 4,8 % orto-orto (Batlle 1171063009).

O ensaio foi instalado num campo experimental em Elvas, Herdade da Comenda (38° 54’N; 7° 09’W; altitude: 272m), que possui um aluviossolo moderno com a seguinte composição: textura média; pH 6,0; 1,07 % de matéria orgânica; > 200 ppm P; 158 ppm K; > 125 ppm Mg; 64 ppm Fe; > 100 ppm Mn; 3,5 ppm Zn; 1,8 ppm Cu; 0,07 % N.

A sementeira, que foi ajustada tendo em conta a percentagem de germinação e o peso de 1000 grãos, visando uma sementeira de 279 grãos viáveis / m<sup>2</sup>, ocorreu em dezembro, tendo as plantas completado o respetivo ciclo em junho (2013 - 2014).

A adubação de fundo foi calculada de acordo com a análise de solos, previamente efetuada no terreno onde o ensaio foi instalado, utilizando-se para o efeito o adubo Foskamónio 14-25-8 (200 kg ha<sup>-1</sup>). A adubação de cobertura foi efetuada em duas vezes, utilizando ureia 46 %, 150 kg ha<sup>-1</sup> (69 kg N ha<sup>-1</sup>) no total. No final do afilhamento aplicaram-se 120 kg ha<sup>-1</sup> e no espigamento, 30 hg ha<sup>-1</sup>.

Quanto ao tratamento de biofortificação, procedeu-se à aplicação foliar de ferro quelatado por E.D.D.H.A. 4,8 % orto-orto (Batlle 1171063009). Para o efeito, delinearam-se 15 talhões, cada um com a área de 9 m<sup>2</sup> (6m x 1,5m), correspondendo a triplicados de 5 tratamentos diferentes. Nos talhões controlo não se procedeu à aplicação foliar de ferro. Nos talhões submetidos a biofortificação procedeu-se à aplicação foliar das seguintes concentrações de ferro: 1x (8,1 g de ferro quelatado), 2x (16,2 g de ferro quelatado), 4x (32,4 g de ferro quelatado) e 6x (64,8 g de ferro quelatado) diluídas em 0,3L de água. O ferro foi aplicado em 3 fases do ciclo de desenvolvimento da cultura (encanamento, espigamento e grão leitoso) (Figura 2.3).



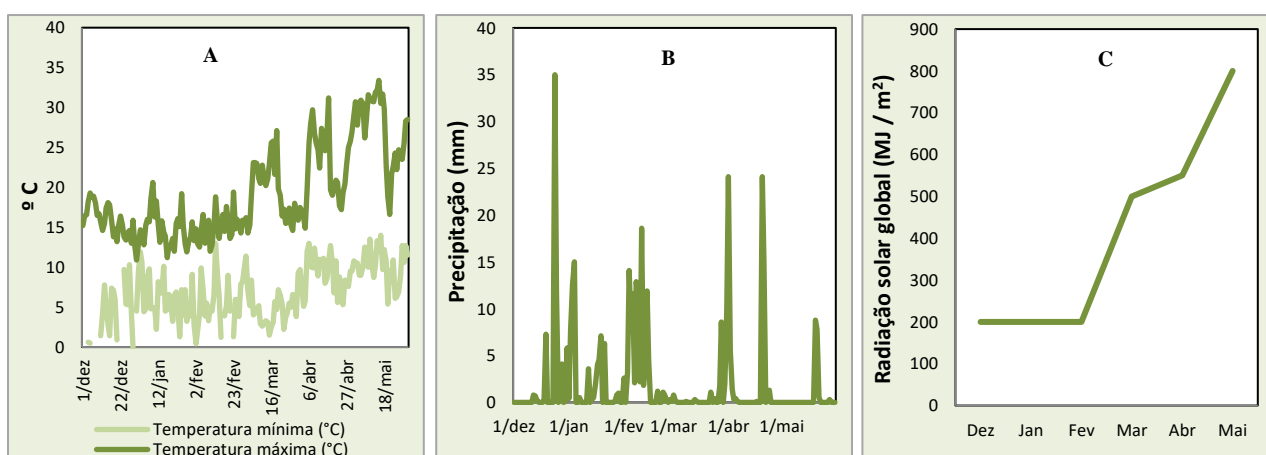
**Figura 2.3** – Perspetiva geral do crescimento de plantas da variedade de *Triticum durum* (Marialva), em campo experimental. Detalhe (A) e aspeto geral do ensaio (B).

As operações culturais efetuadas durante o ensaio assim como a respetiva data de realização encontram-se sistematizadas na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** – Operações culturais efetuadas no campo experimental da Herdade da Comenda em Elvas (38° 54’N; 7° 09’W; altitude - 272m).

Operações culturais efetuadas	Data de realização
Adubação de fundo	2 dezembro 2013
Sementeira	2 dezembro 2013
Monda pré-emergência – Trigonil (3L ha <sup>-1</sup> ) + Roundup (1,5L ha <sup>-1</sup> )	3 dezembro 2013
1ª Adubação cobertura com Ureia 46 % (120 kg ha <sup>-1</sup> )	15 janeiro 2014
1ª Aplicação foliar de Ferro quelatado	14 março 2014
1ª Adubação cobertura com Nitrolusal 27 % (300 kg ha <sup>-1</sup> )	15 março 2014
2ª Aplicação foliar de Ferro quelatado	4 abril 2014
Aplicação de fungicida - Acanto Plus (0,8L ha <sup>-1</sup> )	7 abril 2014
3ª Aplicação foliar de Fe quelatado	8 maio 2014

No decurso do ciclo de vida das plantas verificou-se uma temperatura ambiente mínima e máxima de 0,5 e 33,4 °C, respetivamente. Quanto à precipitação oscilou entre 0,0 e 35,0 mm. A radiação solar global mensal sofreu um incremento acentuado variável entre 200 e 800 MJ / m<sup>2</sup> (Figura 2.4).



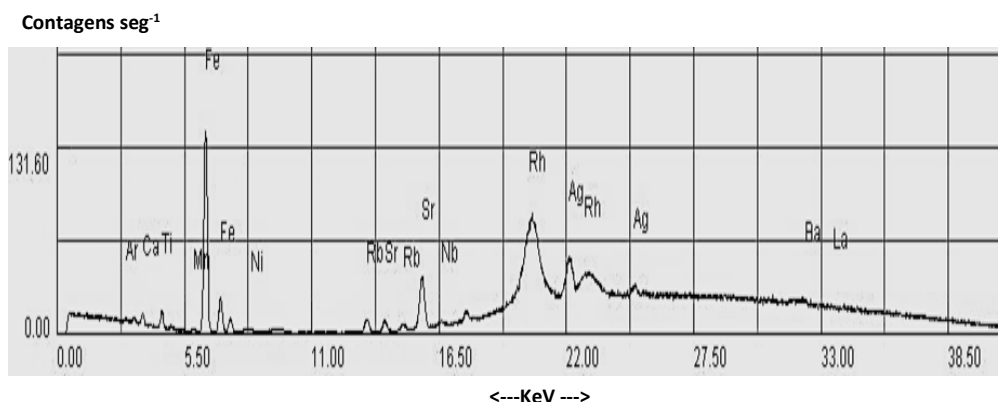
**Figura 2.4** – Condições climáticas verificadas no ensaio em campo experimental durante o período de dezembro de 2013 e maio de 2014. Temperatura ambiente mínima e máxima (A), Precipitação (B) e Radiação solar global mensal (C). Fonte: IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera, 2015.







A análise foi efetuada através de um analisador portátil de raio-X Niton Thermal Scientific, modelo Xlt. As amostras foram colocadas em cuvetes, cobertas por uma película transparente. A leitura ocorreu após emissão de radiação, durante 360 segundos, em atmosfera enriquecida em hélio. Para cada amostra efetuaram-se três leituras. Os resultados (quantificação e análises espectrais – Figura 2.6) foram tratados com recurso ao *software* NITON Data Transfer – XL 3t-36653.



**Figura 2.6** – Exemplo de um espectro eletromagnético na gama dos raios-X realizado numa amostra de solo.

### **2.3.1.3 Espectrofotometria de absorção atômica**

A caracterização química do material vegetal (raiz, parte aérea e grão) foi efetuada após secagem numa estufa com ventilação forçada, a 35 °C, durante 48 h. Após a secagem as amostras foram moídas de modo a passar por um crivo de 0,7 mm (Jones Jr., 2001). Os resultados analíticos estão expressos em relação à matéria seca a 105 °C calculada, em sub-amostras. As concentrações dos elementos P, K, Ca, Mg, Na, Zn, Cu, Fe, Mn, foram determinadas após mineralização por via húmida num digestor VELP série DKL tendo-se efetuado o seguinte procedimento: em cada tubo do digestor colocou-se 0,5 g do material vegetal em barquinha de papel de filtro e adicionou-se 8 mL de ácido nítrico. O ácido ficou em contato com a amostra durante uma noite. Seguidamente, os tubos foram colocados no digestor a 100 °C durante uma hora, aumentando-se a temperatura gradualmente até atingir 150 °C mantendo-se esta temperatura até que cessassem os vapores nitrosos (isto é, terminada a destruição da matéria orgânica da amostra). Após arrefecimento adicionaram-se 2 mL de ácido perclórico e levou-se a 200 °C até os digeridos ficarem incolores. Após arrefecimento adicionaram-se 10 mL de água e levou-se a uma temperatura de 100 °C durante cerca de 5 min

até aparecerem fumos brancos indicativos da expulsão de todo o ácido perclórico. Terminada a digestão transferiu-se o extrato para balões volumétricos de 25 mL, lavando-se várias vezes o tubo para arrastar todo o soluto até à aferição do balão.

As análises foram efetuadas em triplicado e em cada conjunto de amostras foi incorporada uma amostra de referência, SRM 1567a certificada pelo National Institute of Standards and Technology (NIST, USA). O doseamento dos elementos foi efetuado por espectrofotometria de emissão de plasma com detetor ótico (ICP-OES radial simultâneo) num aparelho da Thermo Scientific, modelo IRIS Interpid II XSP Radial.

#### **2.3.1.4 Fluorescência de raios X**

O sistema  $\mu$ -EDXRF utilizado no ensaio consiste no M4 Tornado™ (Bruker, Alemanha). Este espectrómetro consiste num tubo de raios X de janela lateral, alimentado por um gerador de alta tensão, de baixa potência e refrigerado. O sistema em causa possui um polícapilar ótico de raios X, o que permite um feixe na amostra de 25  $\mu$ m para radiação incidente com energia da linha Mo K $\alpha$ . O gerador de raios X foi operado a 50 kV e 100  $\mu$ A, sem a utilização de filtros com a finalidade de melhorar a ionização de elementos de baixo número atómico. Para uma melhor quantificação dos elementos pesados utilizou-se um conjunto de filtros entre o tubo de raios X e a amostra, composta por três folhas de Al, Ti e Cu com uma espessura de 100, 50 e 25  $\mu$ m, respetivamente. Todas as análises com filtros foram realizadas com 600  $\mu$ A de corrente.

A deteção de radiação de fluorescência foi realizada por um detetor de silício do tipo SDD, XFlash™, com 30 mm<sup>2</sup> de área e resolução de energia de 142 eV para a linha Mn K $\alpha$ . Com o objetivo de avaliar o mapeamento de distribuição dos elementos minerais, procedeu-se ao corte longitudinal do grão de trigo com uma lâmina cirúrgica de aço inoxidável. As análises foram realizadas sob condições de vácuo (< 20 mbar), diretamente sobre os dois lados do grão de trigo, primeiro no modo de mapeamento e de seguida através da análise de pontos em locais de interesse. Estes espectros pontuais foram adquiridos durante 200 segundos. A sua quantificação realizou-se com recurso ao *software* WinAXIL™ (Camberra, Bélgica), utilizando-se três amostras de referência como modo de comparação. Os materiais de referência padrão utilizados neste ensaio foram os SRM1571 (Orchard Leaves), DC73351 (Tea Leaves) e DC73350 (Poplar Leaves).

### 2.3.2 Microscopia eletrônica de varrimento

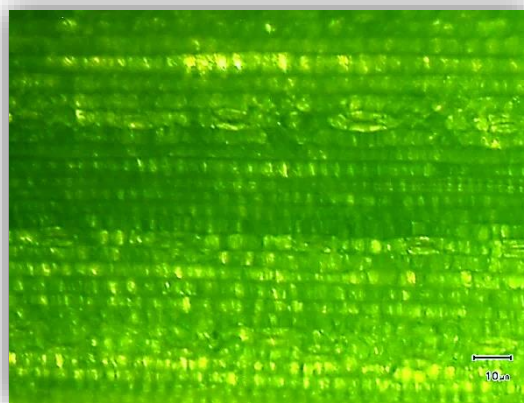
A microscopia eletrônica de varrimento permite visualizar superfícies com uma resolução variável entre 10 e 100000x, fornecendo imagens de elevada qualidade. Nesta técnica as amostras são bombardeadas com eletrões numa câmara de vácuo, produzindo eletrões com origem secundária que são capturados e interpretados (Galhano *et al.*, 1999).

Neste contexto, amostras de sementes de *Triticum durum* foram desidratadas utilizando um sistema Balzers Union CPD 020 (Balzers Union Aktiengesellschaft, Balzers, Liechtenstein) e posteriormente metalizadas (ouro-paládio), recorrendo-se à utilização de um microscópio eletrónico de varrimento JEOL JSMT330A, acoplado a um micro analisador de raio-X Tracor Northern Series II. Os grãos foram cortados transversalmente e longitudinalmente e analisados a 20Kv, usando um “static beam spot”, sob condições estandardizadas durante 60 segundos.

### 2.3.3 Microscopia ótica

A análise de estomas das folhas dos diferentes tratamentos foram efetuadas num microscópio ótico (Optika DM-25 Microscope, Itália), com escala milimétrica, com ampliação de 40x e acoplado a um computador Toshiba Satellite L50-B-1X3.

A contagem de estomas efetuou-se nas páginas adaxial e abaxial das folhas, adotando-se, como sistemas de contagem, linhas individuais e contagens totais por unidade de área (Figura 2.7).



**Figura 2.7-** Exemplo de uma imagem da epiderme, contendo estomas, de uma amostra da folha bandeira de *Triticum durum*, obtida por microscopia ótica.

### 2.3.4 Trocas gasosas foliares

A taxa fotossintética líquida ( $P_n$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e a concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ) foram avaliadas em cada tratamento, sob condições de estado fotossintético estacionário, após cerca de 2 h de exposição à luz, através da utilização de um sistema portátil de análise de gás por infravermelho (Li-Cor 6400, LiCor, Lincoln, EUA).

### 2.3.5 Fluorescência da clorofila *a*

A fluorescência da clorofila *a* (Chl) foi medida nas mesmas condições de determinações de troca gasosa utilizando um sistema de PAM-2000 (H. Walz, Effeltrich, Alemanha), como descrito anteriormente (Ramalho *et al.*, 2013), seguindo fórmulas discutidas por outros autores (Kramer *et al.*, 2004; Krause e Jahns, 2004; Schreiber, 2004).

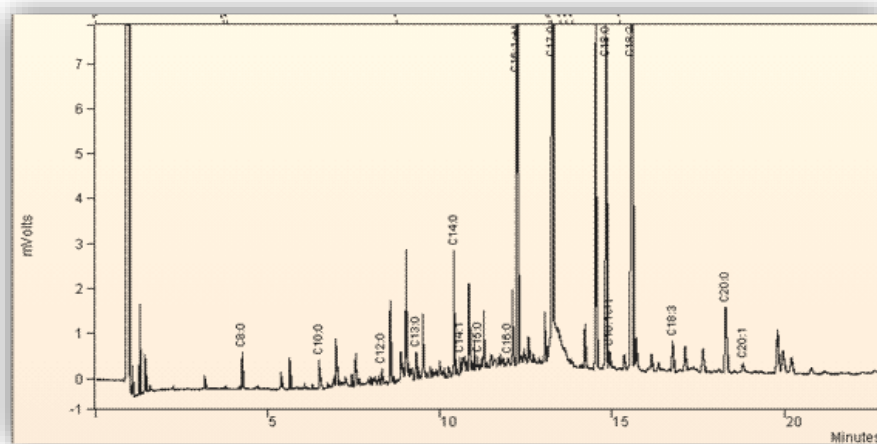
De forma sucinta, as medições de fluorescência mínima ( $F_o$ ) e a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) foram realizadas em amostras foliares adaptadas à escuridão durante a noite.  $F_o$  indica a emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila *a* na fase que antecede a migração de eletrões para os centros de reação e foi determinada utilizando uma luz fraca ( $< 0,5 \mu\text{mol Q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).  $F_v/F_m$  representa a eficiência fotoquímica potencial / máxima do fotossistema II (PSII), e foi determinado através da utilização de um pulso / flash saturante de luz actínica de  $7500 \text{ Q } \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com a duração de 0,8 s saturação. Complementarmente foram efetuadas diversas medidas em condições de equilíbrio dinâmico da fotossíntese, usando uma irradiância de ca.  $485 \mu\text{mol Q m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz actínica (fornecida pelo PAM-2000) e flashes saturantes. Desta forma avaliaram-se: o  $q_P$ ,  $q_N$  (Van Kooten e Snel, 1990),  $q_L$  (Kramer *et al.*, 2004), NPQ (Adams *et al.*, 1995),  $Y_{II}$  ( $= \phi_e$ ),  $Y_{(NPQ)}$ ,  $Y_{(NO)}$  (Klughammer e Schreiber, 2008),  $F_v'/F_m'$  (Krupa *et al.*, 1993) e  $F_s/F_m'$  (Stirbet e Govindjee, 2011).  $F_o$ , parâmetro necessário para determinação de diversos parâmetros ( $q_P$ ,  $q_L$ ,  $q_N$ ) foi obtido imediatamente após apagar-se a luz actínica, anteriormente à primeira fase rápida da cinética de fluorescência de relaxamento no escuro.  $F_v'/F_m'$  representa a eficiência na conversão energética no PSII à luz;  $q_P$  e  $q_L$  estimam a proporção de energia capturada e canalizada para os eventos fotoquímicos, com base no conceito de antenas do PSII isoladas ( $q_P$ ) ou interligados ( $q_L$ ); NPQ representa o fator de amortecimento da fluorescência não fotoquímico, isto é, a dissipação térmica fotoprotectora;  $Y_{II}$  ( $= \phi_e$ ) é a estimativa de rendimento quântico de transporte fotossintético de eletrões não-cíclico;  $Y_{(NO)}$  consiste na estimativa do rendimento quântico associado à dissipação de energia não regulada, sob a forma de calor e fluorescência;  $Y_{(NPQ)}$  representa o rendimento quântico de dissipação de energia regulada no fotossistema II (Kramer *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011) e  $F_s/F_m'$  é um indicador da taxa de inativação do PSII (Stirbet e Govindjee, 2011).

### 2.3.6 Fração lipídica total e ácidos gordos

Procedeu-se à extração dos lípidos totais da sêmola, após secagem em estufa ventilada (35 °C, 48 h) e moagem do grão de trigo dos diferentes tratamentos num Chopin CD2 com granulometria inferior a 450 µm, segundo o método de Zayas e Lin (1989), com as modificações introduzidas por Ramalho *et al.* (2014). No processamento de cada amostra procedeu-se à adição de 10 mL de n-Hexano (Panreac PA-ACS) a 750 mg de sêmola. Após agitação numa placa de agitação (P Selecta, Agimatic 5), durante 30 minutos, a 700 rpm e à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (Centrifuga Heraeus, Biofuge 28RS) a 4500 g, a 15 °C, durante 10 minutos. Recolheu-se então o sobrenadante (n-Hexano) com uma pipeta de Pasteur, adicionaram-se mais 10 mL de n-Hexano (Panreac PA-ACS) ao precipitado e procedeu-se a nova agitação e centrifugação nas condições já descritas. Os extratos da primeira e segunda extração foram combinados e secos sob fluxo de azoto em banho-maria (40 °C). O extrato seco foi ressuscendido em 500 µL de etanol:tolueno (1:4) (Merck). Para cada tratamento foram efetuados 3 extratos, guardados em vial, a -30 °C (Clean Pack 1.6 mm).

A saponificação e metilação dos lípidos totais foram efetuadas de acordo com o método de Metcalfe *et al.* (1966). A partir do vial de lípidos totais pipetou-se uma alíquota de 100 µL para um tubo de 25 mL. Procedeu-se à adição de 4 mL de NaOH 0,5N em Metanol (Merck) e agitou-se no Vortex (Vortex-Genie). Colocou-se o suporte em banho-maria, sem agitação, a 65 °C, durante 15 minutos. Adicionaram-se 100 µL de ácido heptadecanóico (C17:0, padrão interno) (Sigma 1mg / mL) e 2 mL de metanol - BF<sub>3</sub> (Merck Schuchardt OHG) em cada tubo. Colocou-se novamente o suporte em banho-maria nas condições descritas anteriormente. Procedeu-se à adição de 10 mL de Pentano (ROTH) e de 2 mL de água destilada e agitou-se no Vortex (Vortex-Genie), durante 15 segundos. Deixou-se decantar uma hora e recolheu-se com uma pipeta de Pasteur a fase superior (pentânica). Secou-se, sob fluxo de azoto, em banho-maria (40 °C). A amostra seca foi ressuscendida em 400 µL de etanol:tolueno (1:4) (Merck) e guardada em vial, a -30 °C (Clean Pack 1.6 mm).

Os ácidos gordos metilados foram analisados num cromatógrafo gás-líquido (Varian CP-3380, USA) acoplado a um detetor de ionização de chama. Para a separação dos ácidos gordos utilizou-se uma coluna capilar DB-Wax (J&W Scientific) 30 m, com 0.25 mm de diâmetro interno e 0.25 µm de espessura do filme. O injetor e o detetor foram mantidos a 200 °C e 250 °C, respetivamente. Utilizou-se hidrogénio como gás de arraste (1 mL / min) e uma partição de fluxo de 1 / 50. A identificação dos picos cromatográficos ocorreu pela comparação dos tempos de retenção de cada éster metílico de ácido gordo com misturas de padrões (Sigma, Supelco e Restek). Os resultados foram apresentados como % de cada ácido gordo identificado na fração lipídica (Figura 2.8).



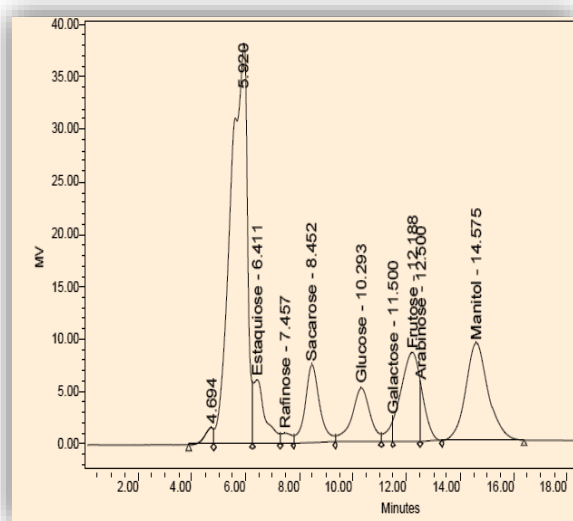
**Figura 2.8** - Exemplo de um registro espectral relativo à separação de ácidos gordos, obtido de acordo com o procedimento adotado para separação e quantificação de ácidos gordos.

### 2.3.7 Açúcares

Os açúcares solúveis foram extraídos a frio segundo o método de Medlicoh e Thompson (1985). Os grãos foram previamente secos numa estufa ventilada (35 °C, 48 h). Procedeu-se à adição de 10 mL de água MQ fria (Millipore) a uma amostra de 400 mg de sêmola (após moagem do grão de trigo dos diferentes tratamentos num Chopin CD2 com granulometria inferior a 450 µm) num tubo de centrífuga de 50 mL (Rochester). Os tubos foram colocados num banho de gelo (para inativação enzimática) sobre uma placa de agitação (P Selecta, Agimatic 5), durante 30 minutos e, posteriormente, os tubos foram colocados num aparelho de ultrassons (Cleaner 2510 E-DTH), durante 5 minutos. Procedeu-se então a uma centrifugação (Centrifuga Heraeus, Biofuge 28RS) a 1500 g (20 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi recolhido com uma pipeta de Pasteur para um frasco de vidro. Repetiu-se o processo nas mesmas condições, para uma lavagem do precipitado. Juntaram-se os extratos da primeira e segunda extração e procedeu-se à respetiva filtragem (filtros Whatman nº 4) a frio. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100 °C, durante 4 minutos e, seguidamente, colocados em gelo durante 6 minutos. Procedeu-se a uma centrifugação (Centrifuga Heraeus, Biofuge 28RS) a 1500 g (15 minutos, 4 °C) e submeteu-se então o extrato aquoso a nova filtragem (Filtros Millex 0.45 µm) para um tubo eppendorf de 1,8 mL.

Procedeu-se à separação e quantificação dos açúcares por HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters, EUA), utilizando um detetor refratrométrico (*Refractive Index Detector*, Waters, 2414), com sistema de solvente (Bomba 125 NM), equipado com uma coluna SugarPak 1 (Waters 6,5 x 300 mm) em forno a 90 °C e *software* Karat 32, versão 8.0, para aquisição e tratamento de dados. Utilizou-se como solvente, a solução aquosa de EDTA de cálcio a 50 ppm, com fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Foram feitos 3 extratos para cada tratamento,

e efetuaram-se duas injeções de cada extrato. As amostras foram colocadas no injetor, com *loop* de 20 µL analisadas em duplicado. Para a identificação dos compostos foi realizada uma análise de padrões de glucose, frutose, sacarose, galactose, rafinose, manose e estaquinose (Sigma-Aldrich). A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas com recurso à curva de calibração e tempo de retenção dos padrões de concentração conhecida, e a quantificação das áreas dos picos dos cromatogramas (Figura 2.9).



**Figura 2.9** - Exemplo de um registro espectral relativo a padrões dos glicídios, de acordo com o procedimento adotado para separação e quantificação de glicídios.

### 2.3.8 Proteínas

A quantificação das proteínas totais do grão, após moagem do grão de trigo dos diferentes tratamentos num moinho Cyclotec 1093 (Tecator, Suécia), foi realizada segundo o método Kjeldhal, de acordo com a ISO 20483:2013 com ligeiras modificações. Numa balança analítica (Mettler PC 180) pesou-se 1 g  $\pm$  0.001 g de amostra. Colocou-se a amostra num tubo de mineralização (Kjeldhal), juntou-se o catalisador (sulfato de potássio + selénio) (Panreac 131532.1211 + Aldrich 229865) e 12,5 mL de ácido sulfúrico 96 % (Sigma-Aldrich, 30743). Homogeneizou-se de forma a assegurar um contato completo da amostra. Colocou-se o tubo no bloco de mineralização pré-aquecido (Bicasa Milano, Mod – BE 97) a  $420 \pm 10$  °C. Após 4 horas de mineralização deixou-se arrefecer. Cada tubo contendo a amostra mineralizada foi posteriormente destilado numa unidade Kjelttec 2200 - Auto Distillation (Foss, Suécia): juntou-se uma solução de hidróxido de sódio (Eka 101516) para neutralizar a quantidade de ácido sulfúrico 96 % (Sigma-Aldrich, 30743) excedente e vapor de água, levando à formação de amoníaco, o qual foi recolhido num copo previamente preparado com ácido bórico (Pronalab 79) e algumas gotas de indicador vermelho de metilo (Fluka 32654). De seguida,

titulou-se (Titulador Automático Radiometer Tim 850) a amoníaco com ácido clorídrico 0,1N (Chem-lab CL05.0311.1000) até se atingir o ponto final. Paralelamente, efetuou-se um ensaio em branco (digestão, destilação e titulação) na ausência de amostra. O teor de azoto, N, expresso em percentagem foi calculado pela equação:

$$N (\%) = [(V_1 - V_0) \times T \times 0,014 \times 100] / m$$

Onde:  $V_0$ - volume de solução de ácido forte gasto no ensaio em branco expresso em mL;  $V_1$ - volume de ácido forte gasto no ensaio com a amostra, expresso em mL; 0,014 - valor, em grama, da quantidade de azoto equivalente à utilização de 1 mL de uma solução de ácido sulfúrico 0,1N; m - massa, em grama, da amostra.

O teor de proteína bruta da amostra foi calculado posteriormente multiplicando o valor obtido pelo fator convencional de 5,7 (ISO 20483:2013).

### **2.3.9 Índice de sedimentação SDS**

Este método, que estima a força do glúten, baseia-se na medição do volume de sedimentação do grão de trigo moído após agitação com uma solução de SDS e ácido láctico (Dick e Quick, 1983). As amostras foram moídas no moinho Cyclotec (Tecator, Suécia) com o crivo de 1mm.

Neste enquadramento, para cada tratamento foram preparadas as seguintes soluções:

- **A** - Solução de azul de bromofenol em água (0,001 % p / v)
- **B** - Solução de ácido láctico (9,5 % v / v)
- **C** - Solução de SDS em água destilada (2 % p / v)
- **D** - Mistura da solução B e solução C na proporção de 1:28.

A amostra (1 g) foi suspensa com azul de bromofenol (solução A) e sujeita a períodos alternados de agitação (vortex) e repouso. Após adição da solução D, os tubos foram sujeitos a períodos alternados de agitação e repouso num agitador oscilante do tipo Brabender (Brabender OHG Duisburg, Alemanha). As amostras foram colocadas na posição vertical e ao fim de 10 minutos procedeu-se à leitura da altura de sedimento.

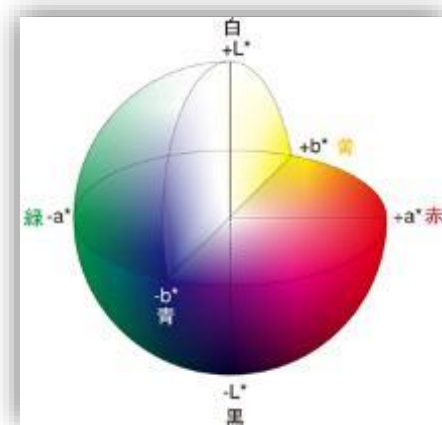
### **2.3.10 Cor**

Procedeu-se à determinação da cor da sêmola, após moagem do grão de trigo dos diferentes tratamentos num Chopin CD2 com granulometria inferior a 450 µm, utilizando o



colorímetro CR- 400 Konica Minolta. A leitura foi efetuada para o luminante D65, em triplicado para cada concentração. O equipamento foi previamente calibrado com leitura num padrão anti reflexo, com as coordenadas Y=85,50; x=0,3185; y=0,3356.

Neste procedimento considerou-se o sistema CIELab. Neste contexto, adotaram-se as coordenadas cromáticas L\*, a\* e b\*, cujas dimensões no espaço correspondem às cores visíveis ao olho humano e separam a luz ambiente ou luminosidade (L\*) no eixo vertical e a cromaticidade no eixo horizontal xy (Figura 2.10).



**Figura 2.10** - Representação de um modelo de espaço colorimétrico CIELab, em que L\* representa a escala de cor entre o preto (0) e o branco (100), a\* varia entre o verde (-) e o vermelho (+), e b\* varia entre o azul (-) e o amarelo (+). (Adaptado de Ribeiro, 2010).

### 2.3.11 Humidade

A humidade das amostras de sêmola, após moagem do grão de trigo dos diferentes tratamentos num Chopin CD2 com granulometria inferior a 450 µm, foi determinada segundo a NP 516 (2000). Pesou-se rapidamente todo o produto da moenda (cerca de 5 g ± 0.001 g), na caixa de tara previamente seca e tarada, com a respetiva tampa. De seguida colocou-se a caixa de tara aberta contendo a toma para análise juntamente com a sua tampa na estufa, durante 90 ± 5 min, a 130 ± 3 °C. Retirou-se rapidamente a caixa de tara da estufa, fechou-se e colocou-se no exsiccador. Após 30 minutos efetuou-se uma pesagem. O teor de água, w, expresso como uma percentagem em massa do produto, foi calculado pela seguinte fórmula:

$$W (\%) = [1 - (m_1 / m_0)] \times 100$$

Onde: m<sub>0</sub> - massa, em gramas, da toma para análise; m<sub>1</sub> - massa, em gramas, da toma para análise após secagem.

### 2.3.12 Cinzas

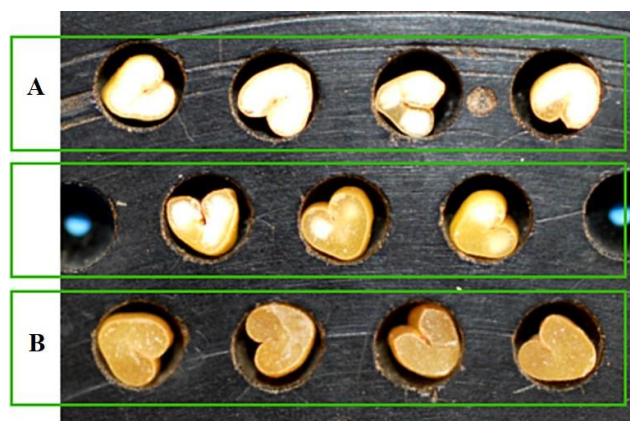
A cinza nas amostras de sêmola, após moagem do grão de trigo dos diferentes tratamentos num Chopin CD2 com granulometria inferior a 450 µm, foi determinada de acordo com a NP 519 (1993). Colocou-se a amostra ( $5 \text{ g} \pm 0.01 \text{ g}$ ) numa cápsula e pesou-se com uma aproximação de 0,0001 g. Colocou-se a cápsula numa mufla a  $900 \pm 10 \text{ }^\circ\text{C}$ , até à inflamação do produto, durante 2 horas, para decorrer a combustão total da amostra. Retirou-se então a cápsula da mufla, deixou-se arrefecer durante 1 minuto sobre uma placa de material termorresistente e depois no exsicador. Após a cápsula ter atingido a temperatura ambiente pesou-se com aproximação de 0,0001 g. O teor de cinza, expresso em percentagem em massa, foi calculado através da seguinte fórmula:

$$(m_1 / m_0) \times 100$$

Onde:  $m_0$  - massa, em gramas, da quantidade de amostra;  $m_1$  - massa, em gramas, do resíduo.

### 2.3.13 Vitreosidade

Para determinação da vitreosidade utilizou-se o método prático com o Faritoma de Pohl em que foram cortados 100 grãos com a guilhotina, sendo considerados vítreos apenas os grãos de fratura totalmente vítrea segundo a norma EN 15585:2008 (Figura 2.11).



**Figura 2.11** – Grão não vítreo (A) e totalmente vítreo (B). (Adaptado de Sieber *et al.*, 2015).

### 2.3.14 Peso de mil grãos

Para cada variedade e tratamento realizou-se a pesagem de mil grãos em triplicado. Nas variedades com menor produção de grãos, o peso de uma amostra menor foi extrapolado para mil grãos.

## **2.4 Tratamento estatístico**

Para avaliação dos resultados experimentais, foi utilizada a análise de variância (*ANOVA*), com uma ou duas variáveis, e determinada a significância pelo teste F, tendo-se usado o teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para estudo comparativo das médias.

### **III – Resultados e Discussão**

---

## Capítulo III - Resultados e Discussão

### 3.1 Biofortificação em ambiente controlado

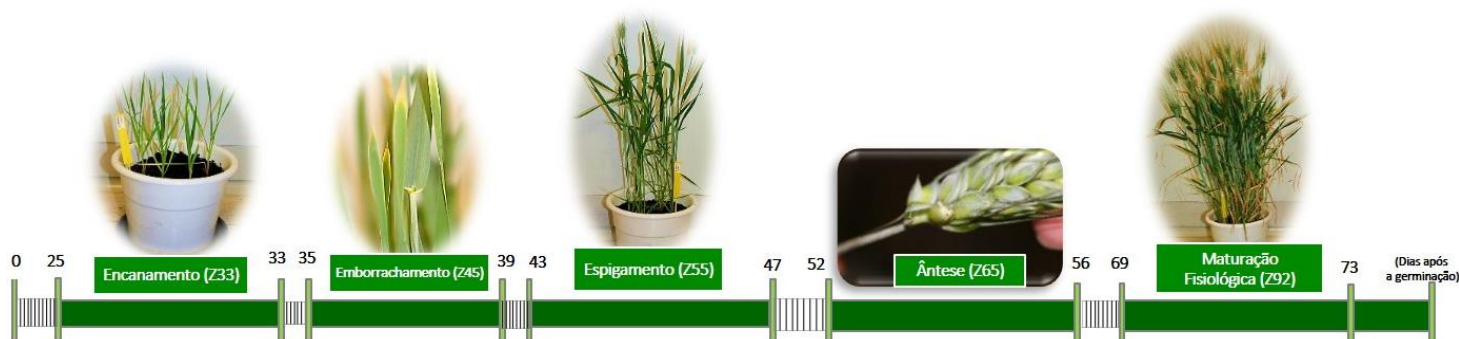
#### 3.1.1 Desenvolvimento fenológico e produção de biomassa

O ciclo de vida da *Triticum durum* variedade Marialva nas condições impostas para o respetivo crescimento em ambiente controlado decorreu, em todos os tratamentos, num período de 123 - 126 dias (Tabela 3.1), tendo o emborrachamento, espigamento, ântese e maturação fisiológica ocorrido ao fim de 35 - 39, 43 - 47, 52 - 56 e 69 - 73 dias após a germinação, respetivamente.

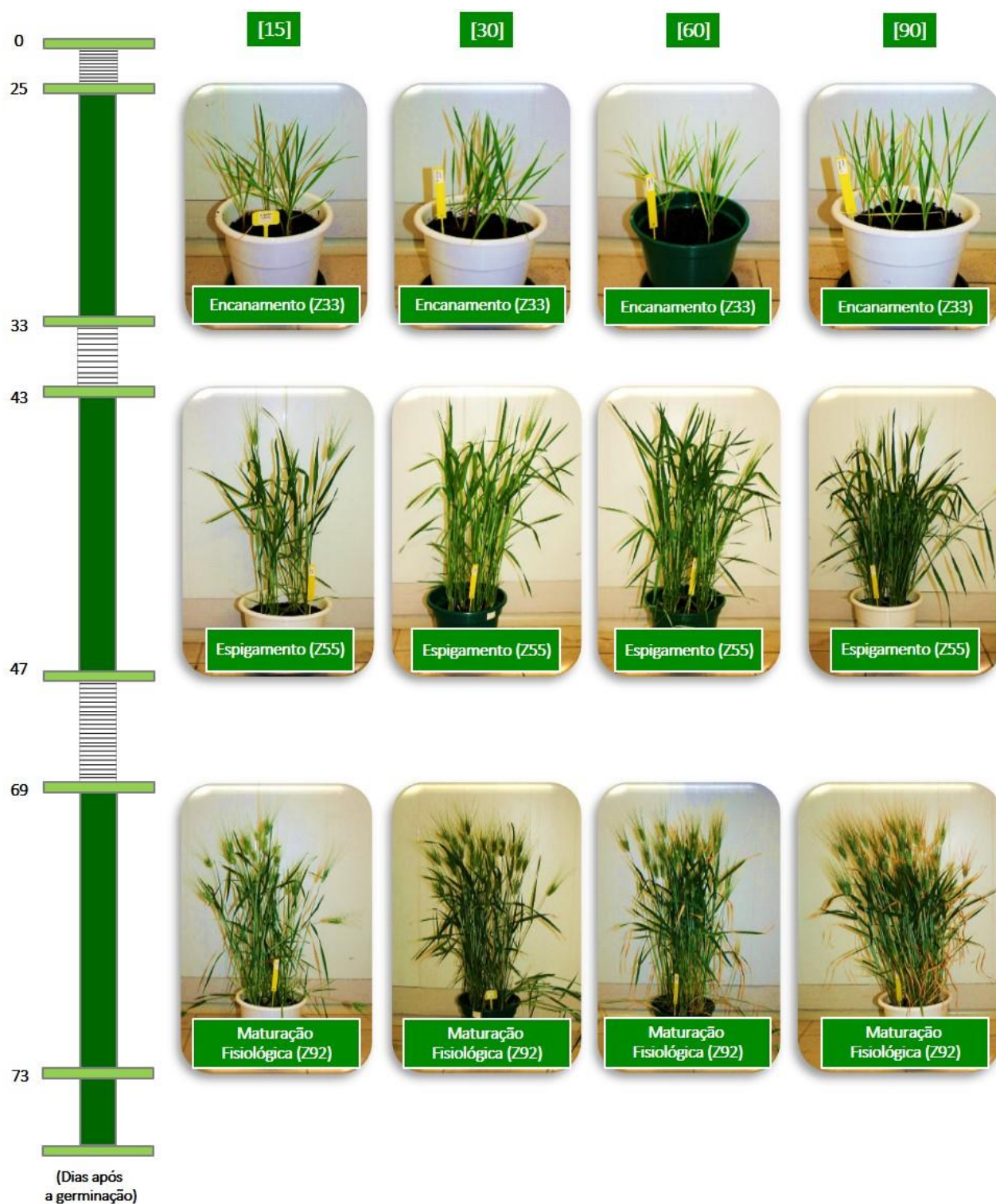
**Tabela 3.1** – Integração temporal do desenvolvimento da *Triticum durum* variedade Marialva.

Fase	Desenvolvimento fenológico	Data de realização (dias após a germinação)
Vegetativa	Emborrachamento	35 – 39
	Espigamento	43 – 47
	Ântese	52 – 56
Reprodutiva	Maturação fisiológica	69 – 73

As Figuras 3.1 e 3.2 representam, de forma esquemática e simplificada, numa escala de tempo arbitrária, os aspetos do desenvolvimento da *Triticum durum*, variedade Marialva em diferentes acontecimentos fenológicos, particularmente encanamento, emborrachamento, espigamento, ântese e maturação fisiológica.

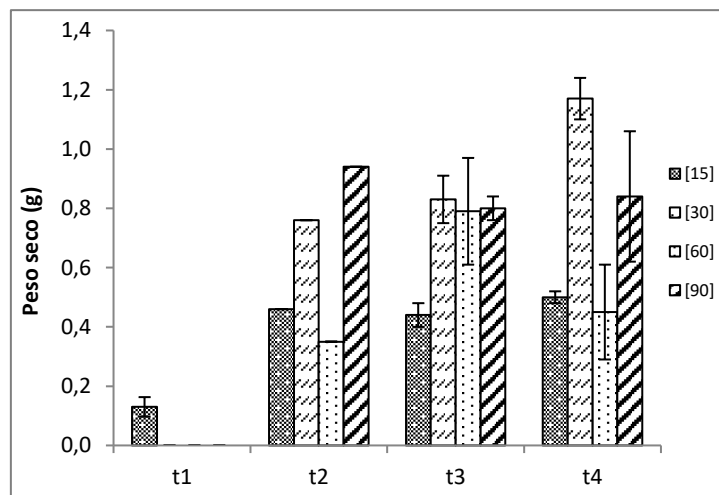


**Figura 3.1** – Aspetos do desenvolvimento da *Triticum durum*, variedade Marialva em diferentes estádios fenológicos com aplicação da escala de Zadoks (Zadoks *et al.*, 1974).



**Figura 3.2** – Aspectos do desenvolvimento da *Triticum durum*, variedade Marialva em diferentes estádios fenológicos e tratamentos com aplicação da escala de Zadoks (Zadoks *et al.*, 1974).

Neste contexto, verificou-se que ao longo do ciclo de vida das plantas, o peso seco médio da raiz (Figura 3.3; Tabela 3.2) decresceu de forma significativa entre os tratamentos 30 mL e 60 mL na segunda e quarta colheita. Constatou-se um incremento significativo da produção de biomassa entre os tratamentos 60 mL e 90 mL na segunda e quarta colheita. Relativamente ao controlo verificou-se uma evolução significativa da produção de biomassa entre a primeira e a segunda colheita, contudo posteriormente não ocorreram variações significativas. O tratamento 30 mL apresentou um incremento significativo entre a terceira e quarta colheita. O peso seco médio da raiz foi mais elevado no tratamento 60 mL, na terceira colheita e no tratamento 90 mL não ocorreram variações significativas. Os tratamentos 15 mL e 90 mL não apresentaram uma variação significativa na produção de biomassa, porém verificou-se que no tratamento 30 mL ocorreu um incremento significativo na quarta colheita, por oposição ao tratamento 60 mL, cujo valor referente à terceira colheita foi máximo. Uma análise comparativa entre os tratamentos 15 mL e 90 mL permitiu constatar que uma solução nutritiva completa de Hoagland estimula a produção de biomassa seca na raiz. No tratamento 30 mL verificou-se que esta solução nutritiva completa estimulou a produção de biomassa da raiz, particularmente entre a terceira e quarta colheita (fase subsequente à ântese). Relativamente ao tratamento 60 mL verificou-se uma acentuada heterogeneidade no desenvolvimento das plantas, aspeto que induziu um peso seco significativamente mais elevado na terceira colheita.



**Figura 3.3** – Biomassa seca média da raiz e respetivo erro padrão (n=3) para cada concentração e colheita.

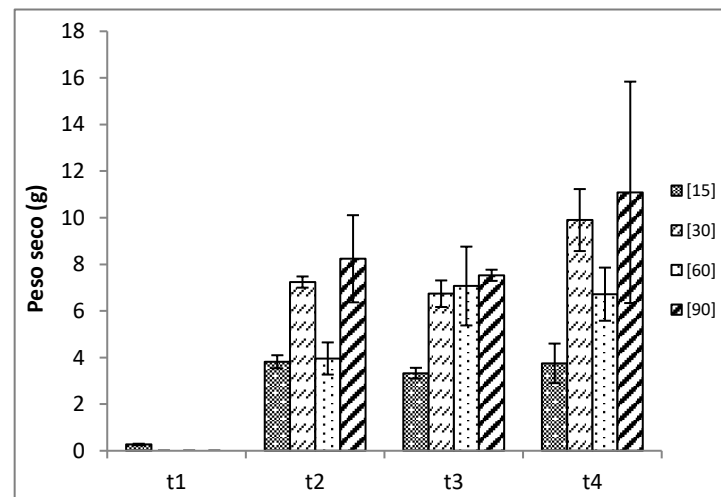
**Tabela 3.2** – Média do peso seco da raiz, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) do peso seco da raiz (g) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s* mostram as diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>t1</b>	0,13 ± 0,033 (s t)	---	---	---
<b>t2</b>	0,46 ± 0,001 (b, c, r)	0,76 ± 0,001 (a, b, s)	0,35 ± 0,001(c, s)	0,94 ± 0,001 (a, r)
<b>t3</b>	0,44 ± 0,040 (b, r, s)	0,83 ± 0,080 (a, s)	0,79 ± 0,180 (a, r)	0,80 ± 0,040 (a, r)
<b>t4</b>	0,50 ± 0,020 (c, r)	1,17 ± 0,070 (a, r)	0,45 ± 0,160 (c, s)	0,84 ± 0,220 (b, r)

\*Dias após a germinação: t1 = 16, t2 = 70, t3 = 92, t4 = 126.

A produção de biomassa seca na parte aérea do trigo duro não apresentou diferenças significativas em todos os tratamentos ao longo da segunda e terceira colheitas. Na quarta colheita observou-se uma variação significativa no tratamento 15 mL (Figura 3.4; Tabela 3.3).

Verificou-se ainda que nas diferentes colheitas analisadas, a produção de biomassa seca não foi afetada pelas diferentes concentrações em macro e micronutrientes da solução nutritiva. No caso do controlo, a biomassa da parte aérea não variou de forma significativa ao longo do tempo, embora apresentando sempre os valores mais baixos, o que provavelmente está relacionado com um efeito pouco pronunciado da solução nutritiva.



**Figura 3.4** – Biomassa seca média da parte aérea e respetivo erro padrão (n=3), para cada concentração e colheita.



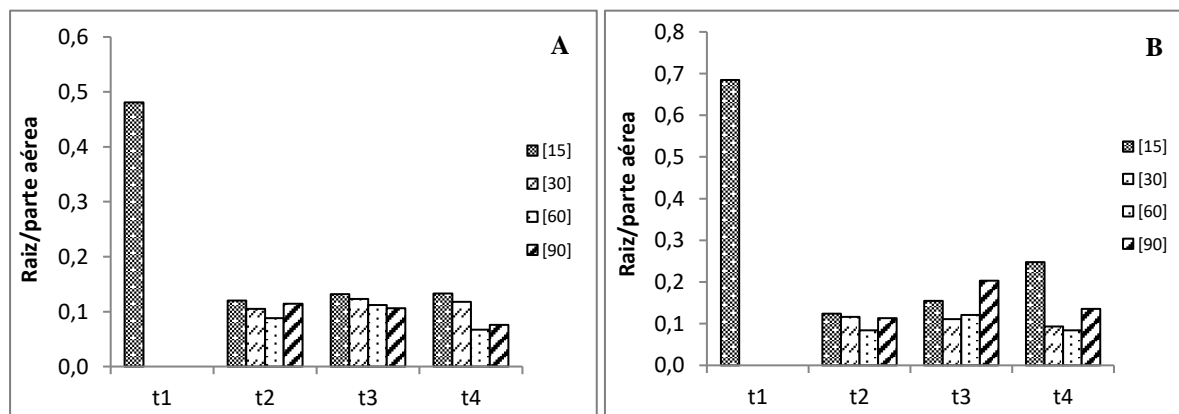
**Tabela 3.3** – Média do peso seco da parte aérea, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) do peso seco da parte aérea (g) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. A letra *r* indica que não existem diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>t1</b>	0,27 ± 0,033 (r)	---	---	---
<b>t2</b>	3,82 ± 0,280 (a, r)	7,24 ± 0,240 (a, r)	3,96 ± 0,690 (a, r)	8,24 ± 1,870 (a, r)
<b>t3</b>	3,33 ± 0,230 (a, r)	6,74 ± 0,570 (a, r)	7,07 ± 1,690 (a, r)	7,53 ± 0,240 (a, r)
<b>t4</b>	3,75 ± 0,850 (b, r)	9,90 ± 1,330 (a, r)	6,72 ± 1,140 (a, b, r)	11,09 ± 4,750 (a, r)

\* Dias após a germinação: t1 = 16, t2 = 70, t3 = 92, t4 = 126.

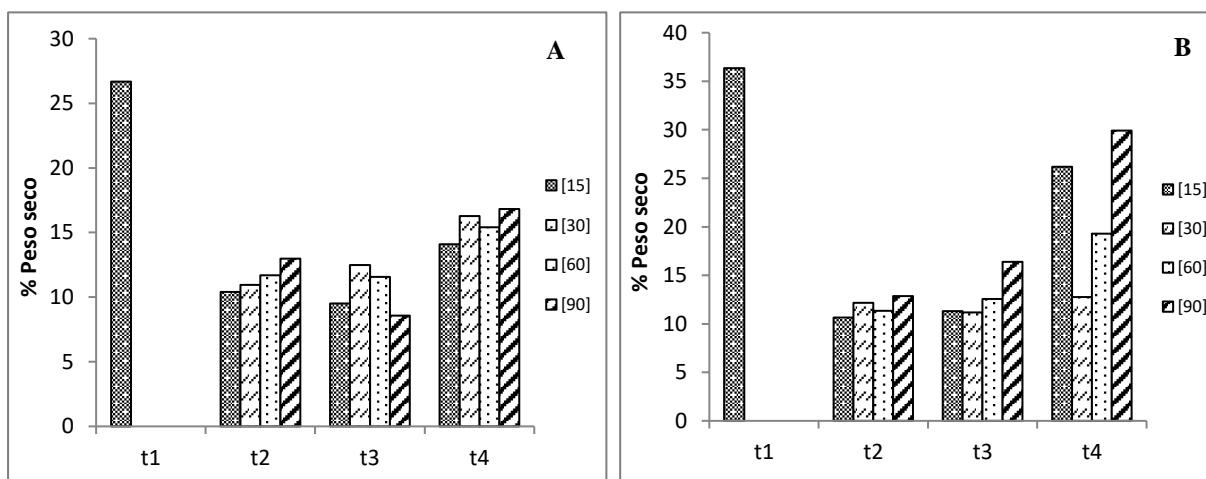
Comparando o primeiro e segundo tempo de ensaio do tratamento controlo verificou-se um decréscimo da razão dos pesos secos médios da raiz relativamente à parte aérea. Contudo, constatou-se um incremento desta razão a partir da segunda para a quarta colheita (Figura 3.5A). No tratamento 30 mL, a razão dos pesos secos médios da raiz relativamente à parte aérea revelou um aumento entre a segunda e a terceira colheita, ainda que com uma estabilização subsequente na quarta colheita. No tratamento 60 mL, a razão dos pesos secos médios da raiz, relativamente à parte aérea, revelou um valor máximo na terceira colheita, enquanto no tratamento 90 mL decresceu progressivamente a partir da segunda colheita.

Relativamente ao controlo, o valor de t1 terá decorrido de um desenvolvimento mais pronunciado da raiz, aspeto que terá favorecido a absorção de nutrientes para o subsequente desenvolvimento da parte aérea. Posteriormente, verificou-se um desenvolvimento relevante da parte aérea, aspeto que determinou o decréscimo da razão entre o peso seco médio da raiz relativamente à parte aérea na segunda, terceira e quarta colheita. Nestes tempos de ensaio, com o aumento das concentrações na solução nutritiva (entre 15 mL e 90 mL), ocorreu uma inibição no desenvolvimento da biomassa seca média na raiz. A única exceção prende-se com o tratamento 90 mL na segunda e quarta colheita.



Relativamente ao peso fresco, partindo da comparação do primeiro e segundo tempo de ensaio do controlo, verificou-se um decréscimo da razão dos pesos frescos médios da raiz relativamente à parte aérea. Adicionalmente detetou-se um incremento desta razão partindo da segunda para a quarta colheita (Figura 3.5B). No tratamento 30 mL, a razão dos pesos frescos médios da raiz, relativamente à parte aérea, revelou um decréscimo entre a segunda e a quarta colheita. Os tratamentos 60 mL e 90 mL mostraram um valor máximo na terceira colheita. Na segunda e quarta colheita, nos tratamentos 15 mL, 30 mL e 60 mL, a razão dos pesos frescos médios da raiz relativamente à parte aérea decresceu, com exceção do tratamento 90 mL, aspeto que mostrou, proporcionalmente, um peso fresco da parte aérea superior.

Equacionando a proporção do peso seco da raiz, constatou-se para o controlo um decréscimo entre o primeiro e segundo tempo de ensaio. Verificou-se ainda um valor mínimo na percentagem de peso seco na terceira colheita (Figura 3.6A). Colateralmente, detetou-se, particularmente nos tratamentos 30 mL e 60 mL, um incremento da proporção de peso seco ao longo dos diferentes tempos de colheita. O tratamento 90 mL apresentou um valor mínimo na terceira colheita.



**Figura 3.6** – Percentagem do peso seco da raiz (A) e da parte aérea (B), nas diferentes amostras, para cada concentração e colheita.

Na parte aérea verificou-se, para o controlo um decréscimo da percentagem de peso seco, comparando o primeiro e segundo tempo de ensaio e, posteriormente, um incremento da percentagem de peso seco partindo da segunda para a quarta colheita (Figura 3.6B). Nos tratamentos 60 mL e 90 mL ocorreu ainda um incremento da percentagem de peso seco ao longo dos diferentes tempos de colheita.

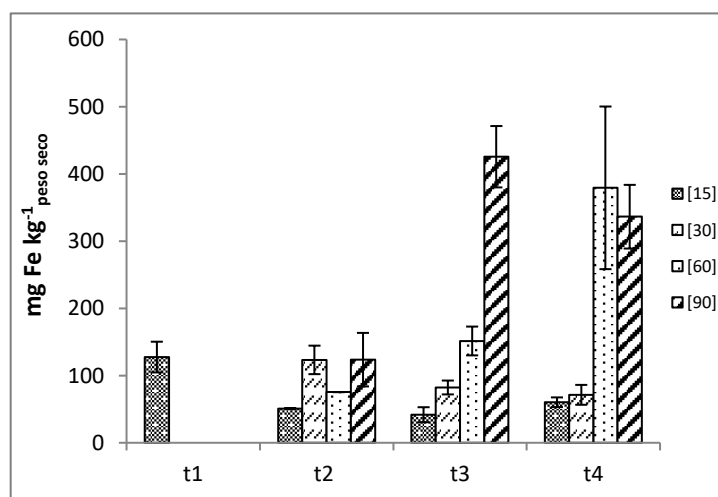
### 3.1.2 Nutrição mineral

#### 3.1.2.1 Mobilização e acumulação de elementos minerais

##### 3.1.2.1.1 Micronutrientes

##### 3.1.2.1.1.1 Ferro

Nos tratamentos mais elevados (60 mL e 90 mL) ocorreu um aumento da concentração média de ferro na raiz ao longo do tempo, enquanto que no tratamento 30 mL observou-se uma diminuição (Figura 3.7; Tabela 3.4). No caso controlo verificou-se um incremento ténue da segunda para a quarta colheita, *i.e.* de 50,99 para 60,28. Verificou-se que em todos os tratamentos não ocorreram variações significativas na segunda colheita, porém na terceira colheita surgiram teores significativamente mais elevados no tratamento 90 mL, e na quarta colheita as concentrações significativamente mais elevadas ocorreram nos tratamentos 60 mL e 90 mL.



**Figura 3.7** – Concentração de ferro na raiz e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.

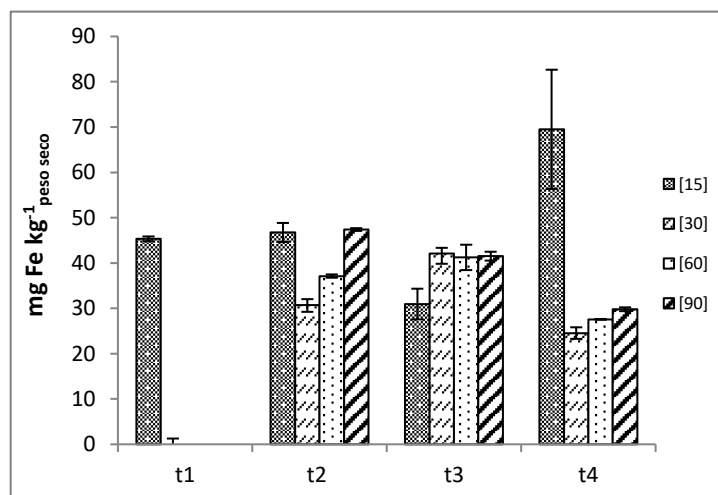
**Tabela 3.4** – Média da concentração de ferro, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração de ferro na raiz ( $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
t1	127,49 ± 22,889 (r)	---	---	---
t2	50,99 ± 0,001 (a, r)	123,31 ± 21,190 (a, r)	75,41 ± 0,001 (a, s)	123,66 ± 39,803 (a, s)
t3	41,75 ± 11,162 (b, r)	82,27 ± 10,311 (b, r)	151,45 ± 21,439 (b, s)	425,59 ± 45,631 (a, r)
t4	60,28 ± 7,221 (b, r)	71,32 ± 14,802 (b, r)	379,30 ± 120,957 (a, r)	336,36 ± 47,368 (a, r)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

O perfil dos tratamentos 15 mL e 30 mL parece evidenciar que a acumulação de ferro é um processo controlado no plano metabólico ao longo do ciclo de vida da planta. Por oposição, nos tratamentos 60 mL e 90 mL o aumento da acumulação de ferro na raiz aponta para um incremento da absorção ou um défice na capacidade de translocação para a parte aérea. Esse processo, que ocorre precocemente no tratamento 90 mL, poderá ainda indiciar um limite de toxicidade, contudo uma constatação deste processo requer outros estudos que não se enquadram nos objetivos deste projeto.

Na parte aérea, os perfis relativos à respetiva concentração variaram de forma significativa entre os tratamentos e as diferentes colheitas (Figura 3.8; Tabela 3.5). Os níveis de ferro foram mais elevados na quarta colheita para o tratamento 15 mL e na terceira colheita para os tratamentos 30 mL e 90 mL. À exceção do tratamento 15 mL, nos restantes tratamentos, na segunda e terceira colheita, prevaleceu uma concentração mais elevada de ferro.



**Figura 3.8** – Concentração de ferro na parte aérea e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.

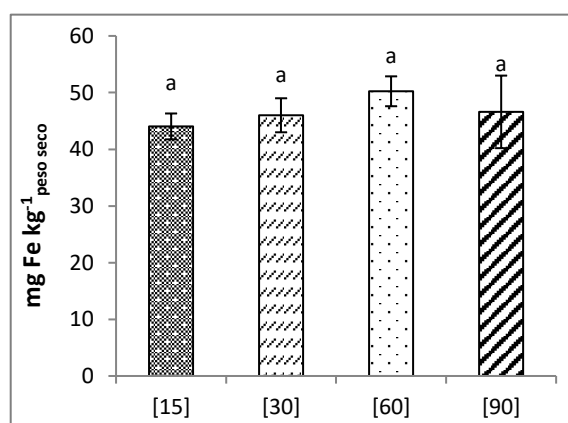
**Tabela 3.5** – Média da concentração de ferro, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração de ferro na parte aérea ( $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s*, *t* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
t1	45,34 ± 0,533 (s)	---	---	---
t2	46,74 ± 2,105 (a, s)	30,76 ± 1,524 (b, r, s)	37,12 ± 0,364 (a, b, r, s)	47,40 ± 0,305 (a, r)
t3	30,95 ± 3,388 (a, t)	42,07 ± 2,241 (a, r)	41,24 ± 2,798 (a, r)	41,52 ± 0,977 (a, r, s)
t4	69,51 ± 13,148 (a, r)	24,54 ± 1,279 (b, s)	27,58 ± 0,083 (b, s)	29,80 ± 0,423 (b, s)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

De acordo com Smith *et al.* (1984), o teor crítico de deficiência de ferro na parte aérea, embora variando com as espécies, pode oscilar entre 50 - 150 mg kg<sup>-1</sup> peso seco. Este teor reporta à totalidade de ferro para caracterizar o estado nutricional de plantas cultivadas em ensaios de campo. Note-se contudo que esta deficiência depende do tipo de solo, do estado fenológico da planta e de fatores climáticos e nutricionais (Brown e Jones, 1975; Davis *et al.*, 1984). Paralelamente reconhece-se que a toxicidade com ferro constitui um grave problema na produção agrícola, situando-se os teores críticos acima de 500 mg kg<sup>-1</sup> peso seco (Nhung *et al.*, 1966; Foy *et al.*, 1978; Yamauchi, 1989). Neste enquadramento, a tolerância das plantas à toxicidade de ferro também é influenciada por diversos fatores, incluindo a idade da planta, estado nutricional e genótipo. Acresce ainda que, caso as plantas sejam submetidas a elevados níveis de ferro por longos períodos, este elemento se acumula gradualmente na parte aérea. Esta toxicidade está frequentemente associada à salinidade e a teores de fósforo reduzidos (Ponnamperuma, 1976). Confrontando os resultados obtidos (Figura 3.8; Tabela 3.5), podemos então concluir que os níveis de ferro na parte aérea, independentemente das variações apontadas, revelaram para os diferentes tratamentos e períodos experimentais que não ocorreram situações de toxicidade, as quais poderiam induzir profundas alterações no metabolismo das plantas.

No grão, entre os tratamentos 15 mL e 60 mL, o teor de ferro aumentou 1,14 vezes (de 44,03 para 50,23 mg kg<sup>-1</sup> peso seco), decrescendo ligeiramente para 46,6 - tratamento 90 mL (Figura 3.9). Note-se, contudo, que estes valores não apresentaram diferenças significativas, pois os teores em ferro no grão embora com um valor máximo no tratamento 60 mL, estão associados a um incremento relativamente baixo face ao controlo (tratamento 15 mL), devido à baixa mobilidade deste elemento na planta (Marschner, 1995).

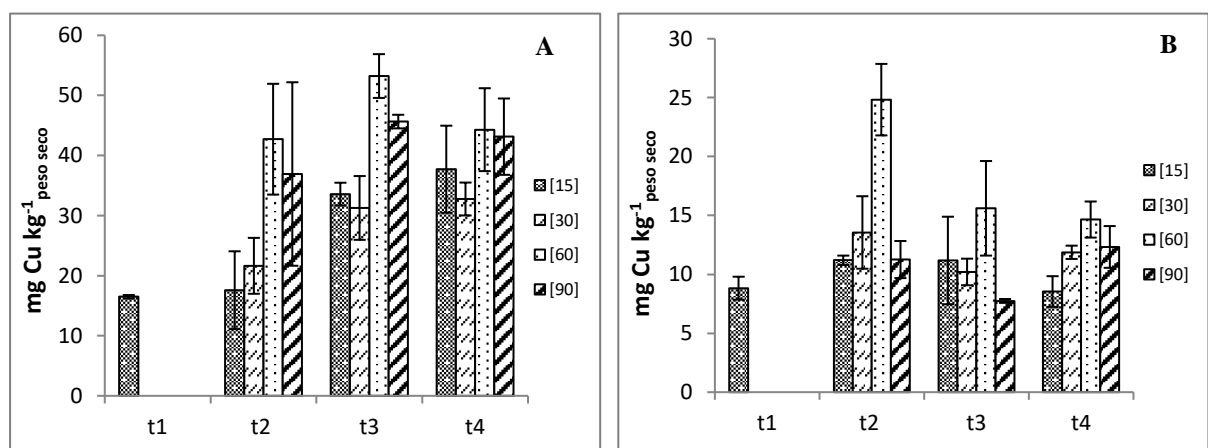


**Figura 3.9** – Concentração de ferro no grão e respetivo erro padrão (n = 2), para cada concentração referente à última colheita. A letra *a* indica a ausência de diferenças significativas entre as concentrações estudadas.

Neste enquadramento, Johnston e Proctor (1977) propõem teores mínimos de ferro no grão de trigo oscilando em torno de  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco, sugerindo-se assim que em condições ótimas de crescimento, face aos teores médios obtidos que atingem *c.a.* de  $48 \text{ mg Fe kg}^{-1}$  peso seco, o grão do genótipo estudado pode ser biofortificado para o dobro (Figura 3.9). De facto, considerando valores obtidos em ensaios de campo, ainda que com genótipos diferentes e condições ambientais diferenciadas, Elsokkary e Lag (1980) detetaram valores mínimos de  $26 \text{ mg Fe kg}^{-1}$  peso seco para o grão de trigo produzido no Egipto; na Finlândia os teores deste elemento corresponderam a  $24 \text{ mg Fe kg}^{-1}$  peso seco (Marjanen, 1980); na Noruega os valores obtidos foram  $17 \text{ mg Fe kg}^{-1}$  peso seco (Lag e Steinnes, 1978); na Polónia obtiveram-se  $15 \text{ mg Fe kg}^{-1}$  peso seco (Glinski e Baran, 1974); nos Estados Unidos da América,  $25 \text{ mg Fe kg}^{-1}$  peso seco (Ebens e Shacklette, 1982).

### 3.1.2.1.1.2 Cobre

A concentração de cobre no raizame, em todos os tratamentos não variou significativamente ao longo do tempo (Figura 3.10 A; Tabela 3.6). Contudo, na segunda e terceira colheita detetaram-se alterações significativas entre os tratamentos, obtendo-se um valor máximo no tratamento 60 mL. Relativamente à quarta colheita, os níveis deste elemento não variaram significativamente entre os diferentes tratamentos. A acumulação de cobre na raiz e na parte aérea permaneceu constante em cada tratamento, o que indicou ausência de toxicidade. Note-se, contudo, que o tratamento 60 mL, ao longo dos diferentes tempos de colheita favoreceu a acumulação de cobre nos tecidos.



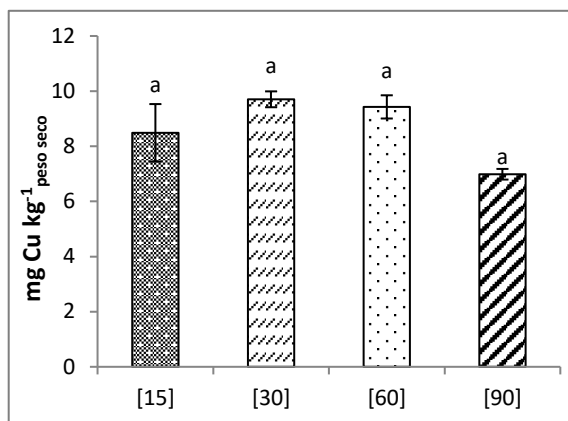
**Figura 3.10** – Concentração de cobre na raiz (A) e parte aérea (B) e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada concentração e colheita.

**Tabela 3.6** – Média da concentração de cobre, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração de cobre na raiz e parte aérea ( $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Raiz</b>				
<b>t1</b>	16,49 ± 0,289 (r)	---	---	---
<b>t2</b>	17,58 ± 6,478 (b, r)	21,64 ± 4,652 (a, b, r)	42,71 ± 9,220 (a, r)	36,92 ± 15,268 (a, b, r)
<b>t3</b>	33,57 ± 1,893 (a, b, r)	31,27 ± 5,308 (b, r)	53,22 ± 3,643 (a, r)	45,64 ± 1,131 (a, b, r)
<b>t4</b>	37,72 ± 7,245 (a, r)	32,76 ± 2,736 (a, r)	44,30 ± 6,900 (a, r)	43,13 ± 6,353 (a, r)
<b>Parte aérea</b>				
<b>t1</b>	8,83 ± 0,975 (r)	---	---	---
<b>t2</b>	11,20 ± 0,395 (b, r)	13,56 ± 3,076 (b, r)	24,83 ± 3,035 (a, r)	11,26 ± 1,573 (b, r)
<b>t3</b>	11,18 ± 3,714 (a, b, r)	10,20 ± 1,128 (a, b, r)	15,61 ± 4,012 (a, s)	7,74 ± 0,164 (b, r)
<b>t4</b>	8,54 ± 1,303 (a, r)	11,87 ± 0,563 (a, r)	14,65 ± 1,532 (a, s)	12,33 ± 1,771 (a, r)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

Dependendo da espécie, órgão e estágio de desenvolvimento da planta, Thiel e Finck (1973) e Robson e Reuter (1981) consideraram que o nível crítico de deficiência de cobre nas partes vegetativas se situa entre 1 e 5  $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco. Por oposição, para a maioria das espécies, os teores críticos de toxicidade de cobre na parte aérea situam-se entre 20 - 30  $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco (Hodenberg e Finck, 1975; Robson e Reuter, 1981; Kabata-Pendias e Pendias, 1992). Saliente-se ainda que uma toxicidade de cobre pode induzir uma deficiência de ferro, ainda que dependendo da fonte de fornecimento de ferro (Taylor e Foy, 1985; Bergmann, 1988). Neste enquadramento, os resultados obtidos (Figura 3.10; Tabela 3.6) indicam que os níveis de cobre não correspondem a valores de toxicidade ou deficiência entre os tratamentos, e ainda que a respetiva absorção radicular não parece ter induzido inibição na correspondente absorção de ferro. Acresce ainda que embora as raízes sejam mais sensíveis a elevadas concentrações de cobre, e que um elevado fornecimento deste elemento geralmente iniba o desenvolvimento radicular, estes órgãos das plantas são locais preferenciais de acumulação de cobre. Aponte-se ainda que nas plantas submetidas a um elevado fornecimento de nutrientes, o teor de cobre das raízes aumenta proporcionalmente com a concentração de cobre no meio externo, persistindo uma elevada restrição na mobilização deste elemento para a parte aérea (Iwasaki *et al.*, 1990).



**Figura 3.11** – Concentração de cobre no grão e respetivo erro padrão ( $n = 2$ ), para cada concentração referente à última colheita. A letra *a* indica a ausência de diferenças significativas entre as concentrações estudadas.

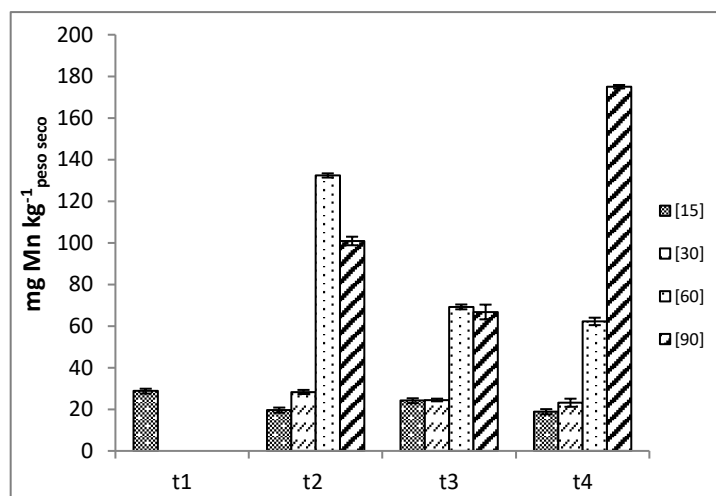
No grão, a acumulação de cobre nos diferentes tratamentos não variou de forma significativa ( $P \leq 0,05$ ), apesar da oscilação entre 6,99 - 9,70 mg kg<sup>-1</sup> peso seco (Figura 3.11). Alguns autores têm constatado que nas sementes de cereais as concentrações mais elevadas de cobre ocorrem no embrião e no revestimento da semente. Assim, Loneragan (1981) propôs teores médios de cobre no embrião entre 2 - 18 mg kg<sup>-1</sup> peso seco e de 8 - 23 mg kg<sup>-1</sup> peso seco no revestimento da semente, apontando-se em sementes inteiras valores máximos de 4 mg kg<sup>-1</sup> peso seco. Neste enquadramento verificou-se que os teores de cobre obtidos neste estudo (Figura 3.11) se integram na faixa apontada por esse autor. Acresce ainda que, quando os teores de cobre obtidos neste estudo são confrontados com valores publicados por outros autores e provenientes de ensaios de campo, a discrepância é mínima. De facto, o teor de cobre no grão de trigo pode variar dentro de uma faixa de valores relativamente estreita devido às tipologias e composição dos solos. No Egipto considera-se um teor médio entre 4,5 e 10,3 mg Cu kg<sup>-1</sup> peso seco (Elsokkary e Lag, 1980); na Finlândia 4,7 - 6,9 mg Cu kg<sup>-1</sup> peso seco (Marjanen, 1980); na Noruega 2,1 - 6,1 mg Cu kg<sup>-1</sup> peso seco (Lag e Steinnes, 1978); 2,6 - 6,5 mg Cu kg<sup>-1</sup> peso seco na Polónia (Glinski e Baran, 1974); 0,6 - 5,4 mg Cu kg<sup>-1</sup> peso seco nos Estados Unidos da América (Zook *et al.*, 1970).

#### 3.1.2.1.1.3 Manganês

No raizame das espécies vegetais, os teores de manganês do tratamento 30 mL não variaram de forma significativa ao longo dos tempos de colheita, contudo no tratamento 90 mL ocorreram valores significativamente mais elevados (Figura 3.12; Tabela 3.7). Verificou-se que em todos os tratamentos ocorreram variações significativas na segunda, terceira e quarta colheitas, visualizando-se na segunda e terceira colheitas teores significativamente mais



elevados no tratamento 60 mL, e na quarta colheita as concentrações significativamente mais elevadas ocorreram nos tratamentos 60 mL e 90 mL.



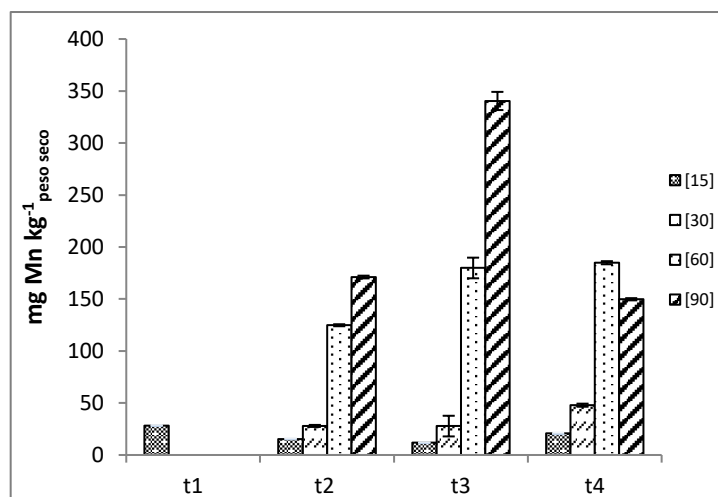
**Figura 3.12** – Concentração de manganês na raiz e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.

**Tabela 3.7** – Média da concentração de manganês, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração de manganês na raiz ( $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a, b, c, d* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r, s, t* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>t1</b>	28,80 ± 1,091 (r)	---	---	---
<b>t2</b>	19,60 ± 1,230 (d, s)	28,33 ± 0,990 (c, r)	132,37 ± 1,005 (a, r)	100,88 ± 2,058 (b, s)
<b>t3</b>	24,21 ± 1,086 (b, r, s)	24,47 ± 0,642 (b, r)	69,20 ± 1,160 (a, s)	66,76 ± 3,538 (a, t)
<b>t4</b>	18,83 ± 1,248 (c, s)	23,15 ± 1,950 (c, r)	62,23 ± 1,786 (b, t)	175,02 ± 0,823 (a, r)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

Na parte aérea, os teores de manganês dos tratamentos 15 mL e 30 mL variaram de forma significativa ao longo dos tempos de colheita, verificando-se nos tratamentos 60 mL e 90 mL valores significativamente mais elevados (Figura 3.13; Tabela 3.8). Detetaram-se diferenças significativas em todos os tempos de colheita. Na segunda e terceira colheita surgiram teores significativamente mais elevados no tratamento 90 mL, e na quarta colheita as concentrações significativamente mais elevadas ocorreram nos tratamentos 60 mL e 90 mL.



**Figura 3.13** – Concentração de manganês na parte aérea e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.

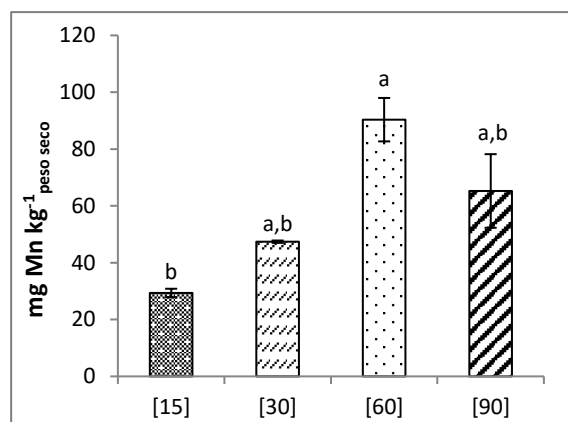
**Tabela 3.8** – Média da concentração de manganês, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração de manganês na parte aérea ( $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a, b, c, d* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r, s, t* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
t1	28,30 ± 0,270 (r)	---	---	---
t2	15,43 ± 0,336 (c, s)	27,94 ± 0,436 (c, s)	124,77 ± 0,965 (b, s)	171,13 ± 1,300 (a, s)
t3	11,82 ± 0,415 (d, s)	27,79 ± 1,201 (c, s)	179,83 ± 9,920 (b, r)	340,42 ± 8,728 (a, r)
t4	20,74 ± 0,710 (d, r, s)	47,89 ± 1,820 (c, r)	184,88 ± 1,480 (a, r)	149,76 ± 1,064 (b, t)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

De acordo com Loneragan (1975), o manganês pode apresentar uma ampla variação nos tecidos de diferentes espécies vegetais cultivadas num mesmo solo, tendo sugerido uma variação entre 30 - 500  $\text{mg Mn kg}^{-1}$  peso seco. Por oposição, a proposta de Gough *et al.* (1979) e Hannam e Ohki (1988) é mais restritiva, considerando que, independentemente da espécie da planta, cultivar ou condições ambientais vigorantes, o nível crítico de deficiência de manganês em diferentes partes vegetativas da planta se situa numa gama que varia entre 10 - 20  $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco. Colateralmente, Andrew e Hegarty (1969) sugeriram que o nível crítico de toxicidade de manganês poderá oscilar entre 380 - 1600  $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco. Considerando as propostas de Andrew e Hegarty (1969), Gough *et al.* (1979) e Hannam e Ohki (1988), constata-se assim que os teores de manganês obtidos nos diferentes tratamentos do nosso estudo não se enquadram em níveis de toxicidade ou deficiência. No grão, os teores de manganês variaram

de forma significativa nos diferentes tratamentos, ocorrendo teores mínimos e máximos (29,37 - 90,34 mg Mn kg<sup>-1</sup> peso seco) nos tratamentos 15 mL e 60 mL, respetivamente (Figura 3.14).



**Figura 3.14** – Concentração de manganês no grão e respetivo erro padrão (n = 2), para cada concentração referente à última colheita. As letras a, b indicam diferenças significativas entre as concentrações estudadas.

De acordo com Edwards e Asher (1982) e Horst (1988), os teores de manganês no grão de trigo podem oscilar entre 15 - 80 mg kg<sup>-1</sup> peso seco. Considerando os resultados obtidos neste estudo (Figura 3.14) verifica-se que se situam no intervalo considerado por esses autores, correspondendo a um teor médio de 58 mg Mn kg<sup>-1</sup> peso seco no grão de trigo. Note-se contudo que, o teor de manganês no grão de trigo é variável em diferentes áreas geográficas. No Egito prevalece um teor que oscila entre 7,5 - 24,2 mg Mn kg<sup>-1</sup> peso seco (Elsokkary e Lag, 1980); na Finlândia varia entre 29 - 103 mg Mn kg<sup>-1</sup> peso seco (Marjanen, 1980); subsistem valores entre 10 - 50 mg Mn kg<sup>-1</sup> peso seco na Polónia (Glinski e Baran, 1974); apontam-se valores entre 32 - 38 mg Mn kg<sup>-1</sup> peso seco nos Estados Unidos da América (Lorenz *et al.*, 1974).

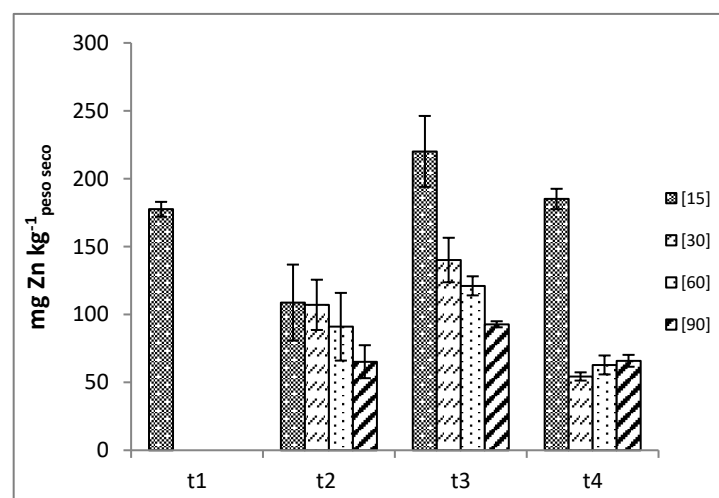
#### 3.1.2.1.1.4 Zinco

Os teores de zinco em solos não poluídos normalmente são inferiores a 125 ppm e em plantas que crescem nesses solos esta concentração varia entre 0,02 e 0,04 g kg<sup>-1</sup> peso seco. As fontes de contaminação de zinco em solos estão frequentemente associadas com chumbo, cobre e cádmio, contudo as suas taxas de absorção e translocação nas plantas são mais elevadas do que o cádmio (Tsonev e Lidon, 2012). Neste contexto, as plantas cultivadas apresentam alterações rápidas e específicas no seu desenvolvimento ao crescerem em solos deficientes em zinco. Uma baixa biodisponibilidade de zinco não só reduz a produtividade da planta, como também prejudica a qualidade nutricional dos produtos. Em áreas de cultivo com agricultura

intensificada, práticas de gestão adicionais (fertilização de zinco) são muitas vezes necessárias de forma a evitar o esgotamento de zinco nos solos. Deverão ser tomadas precauções nas interações com os macronutrientes, em particular com o fósforo no solo ou o azoto na planta que poderão interferir na absorção, translocação e deposição de zinco. Estudos recentes evidenciaram que o fornecimento adequado de azoto pode efetivamente incrementar os níveis de zinco em grãos de trigo. Este efeito benéfico justifica-se porque o fornecimento de quantidades suficientes de azoto incrementa as concentrações de proteína no grão, as quais parecem estar correlacionadas positiva e significativamente com o teor de zinco (Cakmak e Hoffland, 2012).

Por oposição, o excesso de  $Zn^{2+}$  na sequência de uma resposta da planta ao *stress* provoca murchidão, necrose das folhas, declínio da biomassa e inibição da divisão celular. Adicionalmente, o limiar de toxicidade varia acentuadamente entre espécies de plantas e tempo de exposição ao *stress*. Concentrações de zinco compreendidas entre 100 - 400  $\mu g\ g^{-1}$  peso seco causam um decréscimo significativo em parâmetros de crescimento da raiz e da parte aérea em diferentes estádios de desenvolvimento das plantas. Elevadas doses de zinco (65 e 130  $mg\ L^{-1}$ ) podem desencadear uma inibição no crescimento da planta e um decréscimo da biomassa radicular (Tsonev e Lidon, 2012).

Os teores de zinco entre os tratamentos 15 mL e 30 mL, em cada tempo de colheita, aumentaram significativamente, com exceção da segunda colheita. Considerando cada tratamento isoladamente detetaram-se diferenças significativas ao longo das diferentes colheitas, com exceção do tratamento 90 mL. Para todos os casos, os teores de zinco mais elevados situaram-se na terceira colheita (Figura 3.15; Tabela 3.9).



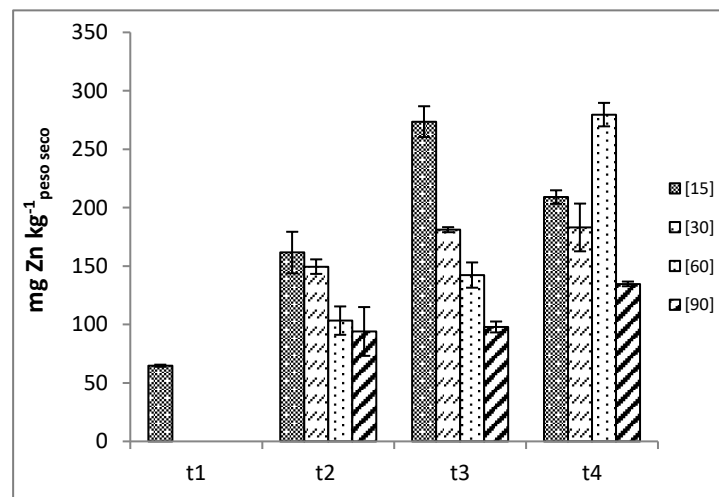
**Figura 3.15** – Concentração de zinco na raiz e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada concentração e colheita.

**Tabela 3.9** – Média da concentração de zinco, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da concentração de zinco na raiz ( $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
t1	177,48 ± 5,448 (r)	---	---	---
t2	108,74 ± 27,995 (a, s)	107,11 ± 18,504 (a, r)	90,97 ± 24,935 (a, r, s)	65,23 ± 12,141 (a, r)
t3	220,10 ± 26,114 (a, r)	140,10 ± 16,390 (b, r)	121,11 ± 7,023 (b, r)	92,79 ± 2,230 (b, r)
t4	185,06 ± 7,504 (a, r)	54,35 ± 3,035 (b, s)	62,83 ± 6,977 (b, s)	65,89 ± 4,366 (b, r)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

Na parte aérea, os perfis relativos à respetiva concentração variaram de forma significativa entre os tratamentos e entre as diferentes colheitas (Figura 3.16; Tabela 3.10). Os níveis de zinco foram mais elevados na terceira e quarta colheita para o tratamento 15 mL e na quarta colheita para os tratamentos 60 mL e 90 mL. Em todos os tratamentos, na terceira e quarta colheita prevaleceu uma concentração mais elevada de zinco. Neste enquadramento, os tratamentos 15 mL e 30 mL sugerem que a acumulação de zinco é um processo controlado no plano metabólico ao longo do ciclo de vida da planta.



**Figura 3.16** – Concentração de zinco na parte aérea e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada concentração e colheita.

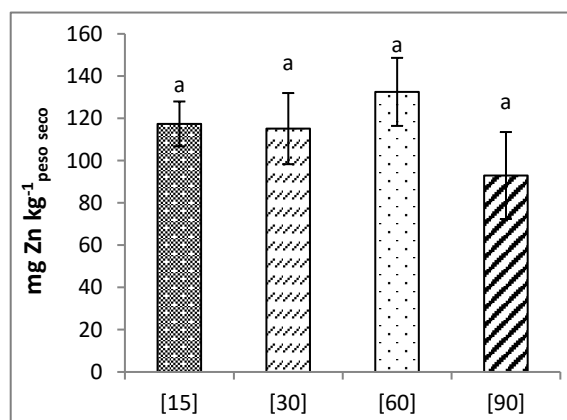
**Tabela 3.10** – Média da concentração de zinco, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da concentração de zinco na parte aérea ( $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s*, *t*, *u* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
t1	64,78 ± 0,889 (u)	---	---	---
t2	161,61 ± 17,760 (a, t)	149,54 ± 6,229 (a, r)	103,34 ± 12,148 (b, s)	94,06 ± 20,877 (b, s)
t3	273,59 ± 13,202 (a, r)	181,16 ± 2,158 (b, r)	142,32 ± 10,810 (b, s)	97,92 ± 4,675 (c, r, s)
t4	209,08 ± 5,790 (b, s)	183,08 ± 20,414 (b, r)	279,63 ± 10,040 (a, r)	134,76 ± 2,008 (c, r)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

Cakmak *et al.* (1994) consideraram que o nível crítico de deficiência de zinco na parte aérea situa-se entre 10 - 20  $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco. No entanto, estes valores podem variar consideravelmente tendo em conta as exigências de cada genótipo e os efeitos das interações do zinco com outros elementos nos tecidos da planta. Paralelamente, os níveis críticos de toxicidade na parte aérea situam-se entre 100 - 300  $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco. De acordo com Ruano *et al.* (1988), o valor médio de concentração de zinco estabelecido em plantas de trigo duro corresponde a 140  $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco, situação que se verificou neste estudo (Figura 3.16; Tabela 3.10). Assim, de acordo com esta propositura, verifica-se que todos os valores obtidos para o zinco nos diferentes tratamentos e períodos experimentais se integram no intervalo proposto por Cakmak *et al.* (1994), muito embora nalguns casos, de acordo com a indicação de Ruano *et al.* (1988), o valor médio tenha sido ultrapassado.

No grão não se verificaram variações significativas entre os diferentes tratamentos, tendo os teores de zinco oscilado entre 92,96 - 132,54  $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco (Figura 3.17).



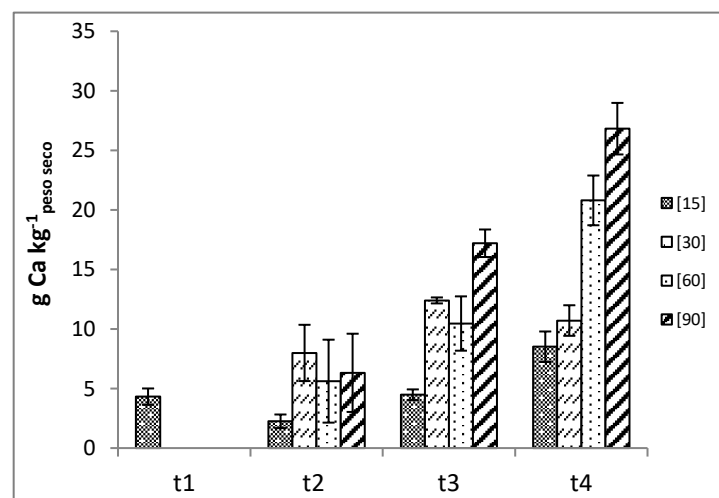
**Figura 3.17** – Concentração de zinco no grão e respetivo erro padrão ( $n = 2$ ), para cada concentração referente à última colheita. A letra *a* indica que não existem diferenças significativas entre as concentrações estudadas.

Segundo Olsen (1972), os teores médios de zinco no grão de trigo oscilam entre 22 - 33 mg kg<sup>-1</sup> peso seco, valores que são substancialmente inferiores às concentrações obtidas nos diferentes tratamentos neste estudo (Figura 3.17). Na base desta discrepância poderão estar diversos fatores, nomeadamente genótipos diferentes, que poderão apresentar características diferentes relativamente à absorção, translocação e acumulação de nutrientes na raiz, parte aérea e semente. De facto, embora também subsistam diferentes tipologias de solos, a utilização de diferentes genótipos de trigo duro também poderá justificar a heterogeneidade de concentrações de zinco detetadas nesta espécie em diferentes áreas geográficas. Com efeito, no Egipto têm sido apontados teores que oscilam entre 19 - 29 mg Zn kg<sup>-1</sup> peso seco (Elsokkary e Lag, 1980); na Finlândia poderá variar entre 25 - 47 mg Zn kg<sup>-1</sup> peso seco (Marjanen, 1980); também se apontaram variações entre 23 - 38 mg Zn kg<sup>-1</sup> peso seco na Polónia (Glinski *et al.*, 1968); apontaram-se ainda valores entre 20 - 47 mg Zn kg<sup>-1</sup> peso seco nos Estados Unidos da América (Zook *et al.*, 1970).

### 3.1.2.1.2 Macronutrientes

#### 3.1.2.1.2.1 Cálcio

Os teores de cálcio nos diferentes tempos de colheita, não variaram de forma significativa nos tratamentos 15 mL e 30 mL; e por oposição, nos tratamentos 60 mL e 90 mL ocorreram valores significativamente mais elevados (Figura 3.18; Tabela 3.11). Verificou-se ainda que em todos os tratamentos não ocorreram variações significativas na segunda colheita, porém na terceira colheita surgiram valores significativamente mais elevados no tratamento 90 mL, e na quarta colheita os valores significativamente mais elevados ocorreram nos tratamentos 60 mL e 90 mL (Figura 3.18; Tabela 3.11).



**Figura 3.18** – Concentração de cálcio na raiz e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.

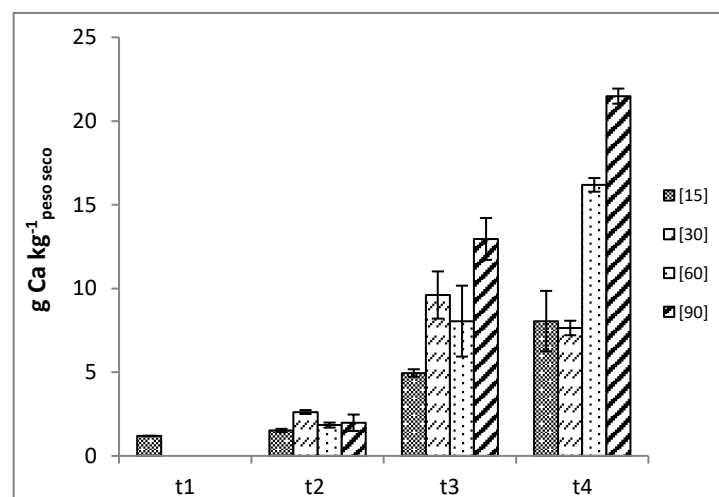
**Tabela 3.11** – Média da concentração de cálcio, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração de cálcio na raiz ( $\text{g kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s*, *t* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
t1	4,32 ± 0,688 (r)	---	---	---
t2	2,25 ± 0,571 (a, r)	7,99 ± 2,362 (a, r)	5,62 ± 3,482 (a, s)	6,32 ± 3,283 (a, t)
t3	4,48 ± 0,448 (b, r)	12,40 ± 0,251 (a, b, r)	10,46 ± 2,281 (b, s)	17,20 ± 1,155 (a, s)
t4	8,51 ± 1,281 (b, r)	10,71 ± 1,284 (b, r)	20,80 ± 2,088 (a, r)	26,82 ± 2,164 (a, r)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

Os tratamentos 15 mL e 30 mL sugerem a existência de uma elevada seletividade metabólica relativamente à acumulação de cálcio ao longo do ciclo de vida da planta. Nos tratamentos 60 mL e 90 mL foi possível observar um aumento da acumulação de cálcio que poderá decorrer de um incremento da absorção ou de um défice na capacidade de translocação para a parte aérea.

Nos tratamentos 15 mL, 60 mL e 90 mL, a concentração de cálcio aumentou progressivamente na parte aérea ao longo dos tempos de colheita, verificando-se no tratamento 30 mL um decréscimo entre a terceira e quarta colheita (Figura 3.19; Tabela 3.12). Entre os tratamentos 15 mL e 90 mL não ocorreram alterações significativas na segunda colheita, porém na terceira e quarta colheita os teores de cálcio aumentaram significativamente.



**Figura 3.19** – Concentração de cálcio na parte aérea e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada concentração e colheita.



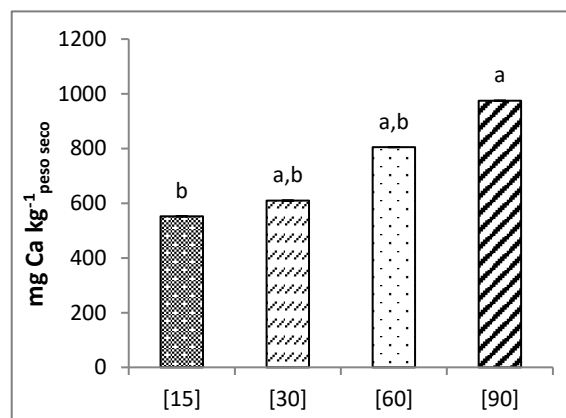
**Tabela 3.12** – Média da concentração de cálcio, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração de cálcio na parte aérea ( $\text{g kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s*, *t* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>t1</b>	1,19 ± 0,013 (s)	---	---	---
<b>t2</b>	1,52 ± 0,096 (a, s)	2,62 ± 0,118 (a, s)	1,84 ± 0,151 (a, t)	1,98 ± 0,489 (a, t)
<b>t3</b>	4,95 ± 0,224 (c, r)	9,61 ± 1,410 (b, r)	8,05 ± 2,119 (b, c, s)	12,96 ± 1,250 (a, s)
<b>t4</b>	8,05 ± 1,805 (c, r)	7,64 ± 0,433 (c, r)	16,19 ± 0,408 (b, r)	21,49 ± 0,451 (a, r)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

O incremento dos teores de cálcio na parte aérea ao longo dos tempos de colheita para cada tratamento revelou um incremento da cinética de translocação a partir da raiz. O aumento dos níveis de cálcio entre os diferentes tratamentos terá resultado do aumento de cálcio na solução nutritiva, o qual está acoplado a um aumento da absorção nas raízes e, por sua vez, determina o aumento da cinética de translocação para a parte aérea. Desta forma, os resultados sugerem que a acumulação de cálcio na parte aérea obedece a um gradiente de concentração com a solução nutritiva. Aponte-se neste contexto que a concentração de cálcio adequada nos tecidos da maioria das plantas vasculares se situa em torno de  $5 \text{ g kg}^{-1}$  peso seco (Raven *et al.*, 2005).

No grão, entre os tratamentos 15 mL e 90 mL, a concentração de cálcio aumentou cerca de 76,5 % (Figura 3.20), situação que poderá estar associada ao aumento da concentração deste elemento na parte aérea.

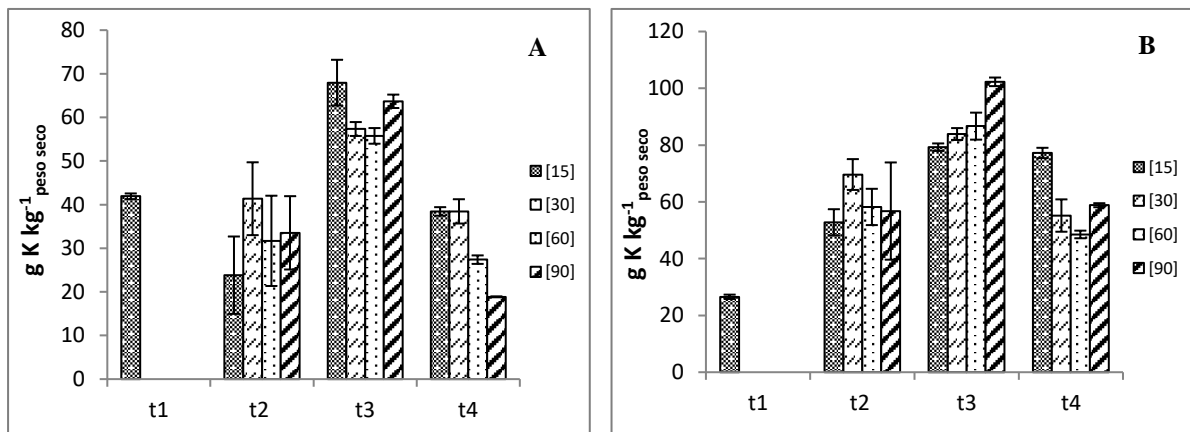


**Figura 3.20** – Concentração de cálcio no grão e respetivo erro padrão ( $n = 2$ ), para cada concentração referente à última colheita. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre as concentrações estudadas.

### 3.1.2.1.2.2 Potássio

Na raiz, os teores de potássio nos diferentes tratamentos, em cada tempo de colheita, apenas mostraram uma variação significativa no tratamento 90 mL na quarta colheita. Considerando cada tratamento isoladamente verificaram-se diferenças significativas ao longo das diferentes colheitas, contudo para todos os casos os teores de potássio mais elevados situaram-se na terceira colheita (Figura 3.21; Tabela 3.13).

Na parte aérea, a concentração de potássio nos diferentes tratamentos, em cada tempo de colheita, não apresentou variações significativas, com exceção do tratamento 15 mL na terceira e quarta colheita. Particularizando, para cada tratamento verificaram-se diferenças significativas ao longo das diferentes colheitas. Em todos os tratamentos, na terceira colheita prevaleceu uma concentração mais elevada de potássio (Figura 3.21; Tabela 3.13).



**Figura 3.21** – Concentração de potássio na raiz (A) e parte aérea (B) e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.

**Tabela 3.13** – Média da concentração de potássio, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração de potássio na raiz e parte aérea (g kg<sup>-1</sup> peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s*, *t* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

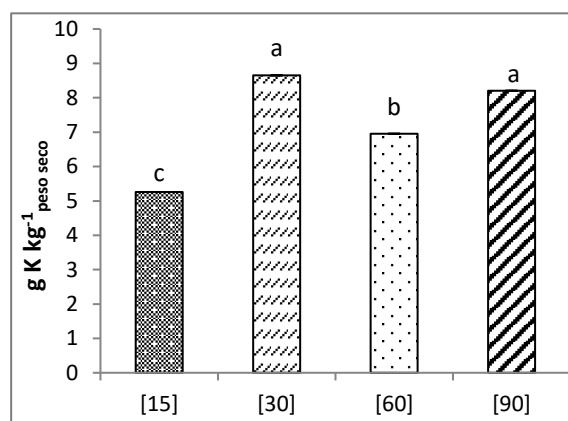
Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Raiz</b>				
<b>t1</b>	41,92 ± 0,647 (s)	---	---	---
<b>t2</b>	23,83 ± 8,866 (a, t)	41,36 ± 8,350 (a, r, s)	31,70 ± 10,346 (a, s)	33,54 ± 8,402 (a, s)
<b>t3</b>	67,97 ± 5,240 (a, r)	57,34 ± 1,593 (a, r)	55,76 ± 1,795 (a, r)	63,69 ± 1,536 (a, r)
<b>t4</b>	38,45 ± 0,974 (a, s, t)	38,46 ± 2,783 (a, s)	27,39 ± 0,977 (a, b, s)	18,87 ± 0,104 (b, s)

**Biofortificação de trigo duro (*Triticum durum*) em ferro, e seriação de parâmetros de qualidade para fabrico industrial de massas alimentícias**

Parte aérea				
<b>t1</b>	26,56 ± 0,768 (t)	---	---	---
<b>t2</b>	52,81 ± 4,603 (a, s)	69,63 ± 5,427 (a, r, s)	58,21 ± 6,388 (a, s)	56,76 ± 17,124 (a, s)
<b>t3</b>	79,26 ± 1,322 (b, r)	83,89 ± 2,094 (a, b, r)	86,67 ± 4,758 (a, b, r)	102,28 ± 1,513 (a, r)
<b>t4</b>	77,22 ± 1,823 (a, r)	55,18 ± 5,697 (b, s)	48,52 ± 1,343 (b, s)	58,82 ± 0,709 (a, b, s)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

A concentração de potássio considerada adequada nos tecidos da maioria das plantas vasculares encontra-se na ordem dos 10 g kg<sup>-1</sup> peso seco (Raven *et al.*, 2005). Segundo Bergmann (1992), os teores médios de potássio na parte aérea oscilam entre 26 - 53 g kg<sup>-1</sup> peso seco. Confrontando os valores destes autores com os resultados obtidos neste estudo (Figura 3.21; Tabela 3.13), verifica-se que os mesmos são substancialmente menores, aspeto que poderá decorrer da utilização de diferentes genótipos, em diferentes estádios de desenvolvimento e submetidos a diferentes condições de crescimento.



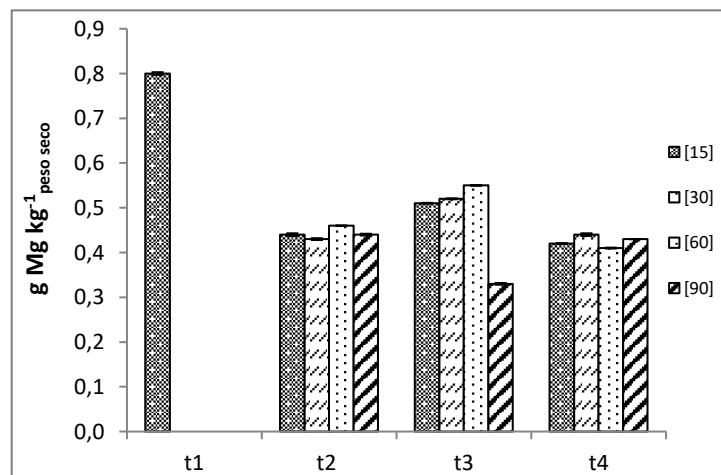
**Figura 3.22** – Concentração de potássio no grão e respetivo erro padrão (n = 2), para cada concentração referente à última colheita. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre as concentrações estudadas.

No grão, com exceção dos tratamentos 30 mL e 90 mL, os restantes tratamentos apresentaram variações significativas, ocorrendo nos tratamentos 15 mL e 30 mL concentrações de potássio mínima e máxima (5,26 - 8,65 g K kg<sup>-1</sup> peso seco), respetivamente (Figura 3.22). Verificou-se assim, para todos os tratamentos, relativamente ao controlo, um acentuado aumento nos teores deste elemento.

### 3.1.2.1.2.3 Magnésio

O magnésio possui diversas funções fisiológicas nos sistemas biológicos, sendo um elemento essencial para o desenvolvimento das plantas (Gransee e Fuhrs, 2013). Este elemento está envolvido no transporte de fotoassimilados em órgãos da planta, assim como na fotossíntese, ativação enzimática e síntese de ATP. Portanto, o crescimento das plantas é significativamente afetado por uma geodisponibilidade reduzida de magnésio. Neste contexto parece ainda verificar-se que uma nutrição adequada de magnésio em plantas de cultura é fundamental para uma maior acumulação de azoto no grão (Cakmak, 2013).

Na raiz, os teores de magnésio nos diferentes tratamentos, em cada tempo de colheita, não apresentaram variações significativas (exceto no tratamento 90 mL, na terceira colheita). Considerando cada tratamento isoladamente verificaram-se diferenças significativas ao longo das diferentes colheitas, contudo para todos os casos os teores de magnésio mais elevados situaram-se na terceira colheita, com exceção dos tratamentos 15 mL e 90 mL (Figura 3.23; Tabela 3.14).



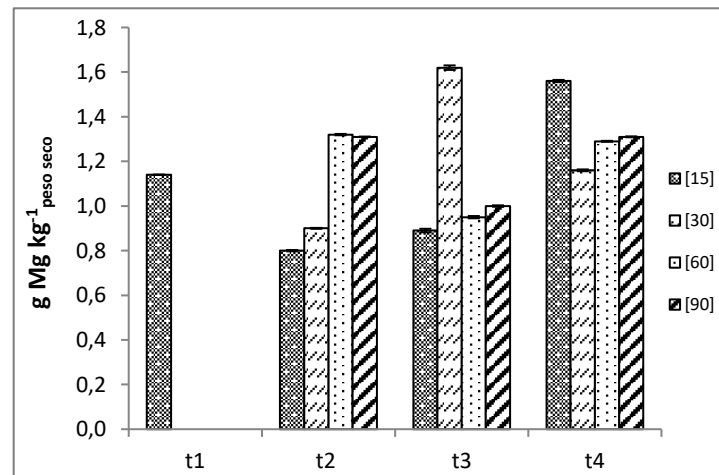
**Figura 3.23** – Concentração de magnésio na raiz e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.

**Tabela 3.14** – Média da concentração de magnésio, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração de magnésio na raiz ( $\text{g kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s*, *t* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
t1	0,80 ± 0,003 (r)	---	---	---
t2	0,44 ± 0,003 (a, t)	0,43 ± 0,002 (a, s)	0,46 ± 0,001 (a, s)	0,44 ± 0,002 (a, r)
t3	0,51 ± 0,001 (a, s)	0,52 ± 0,001 (a, r)	0,55 ± 0,001 (a, r)	0,33 ± 0,002 (b, s)
t4	0,42 ± 0,001 (a, t)	0,44 ± 0,003 (a, s)	0,41 ± 0,001 (a, s)	0,43 ± 0,000 (a, r)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

Na parte aérea, os teores de magnésio dos tratamentos 15 mL e 30 mL variaram de forma significativa ao longo dos tempos de colheita, ocorrendo valores significativamente mais elevados nos tratamentos 60 mL e 90 mL (Figura 3.24; Tabela 3.15). Verificaram-se ainda diferenças significativas em todos os tempos de colheita. Na segunda e terceira colheita detetaram-se teores significativamente mais elevados nos tratamentos 60 mL e 30 mL, respetivamente e na quarta colheita a concentração significativamente mais elevada ocorreu no tratamento 15 mL.



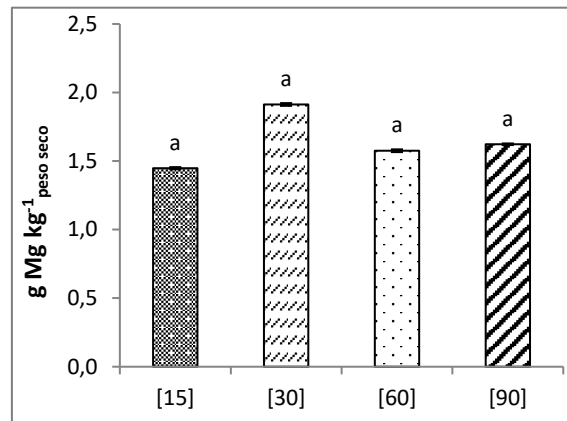
**Figura 3.24** – Concentração de magnésio na parte aérea e respetivo erro padrão (n = 3), para cada concentração e colheita.

**Tabela 3.15** – Média da concentração de magnésio, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração de magnésio na parte aérea ( $\text{g kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s*, *t* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>t1</b>	1,14 ± 0,001 (s)	---	---	---
<b>t2</b>	0,80 ± 0,003 (b, t)	0,90 ± 0,002 (b, t)	1,32 ± 0,003 (a, r)	1,31 ± 0,001 (a, r)
<b>t3</b>	0,89 ± 0,008 (b, t)	1,62 ± 0,010 (a, r)	0,95 ± 0,005 (b, s)	1,00 ± 0,003 (b, s)
<b>t4</b>	1,56 ± 0,005 (a, r)	1,16 ± 0,004 (c, s)	1,29 ± 0,002 (b, c, r)	1,31 ± 0,002 (b, r)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

Os teores de magnésio no grão, não sofreram alterações significativas nos diferentes tratamentos (Figura 3.25). Nos tratamentos 15 mL e 30 mL foram detetadas concentrações de magnésio mínima e máxima ( $1,45 - 1,91 \text{ g Mg kg}^{-1}$  peso seco), respetivamente.

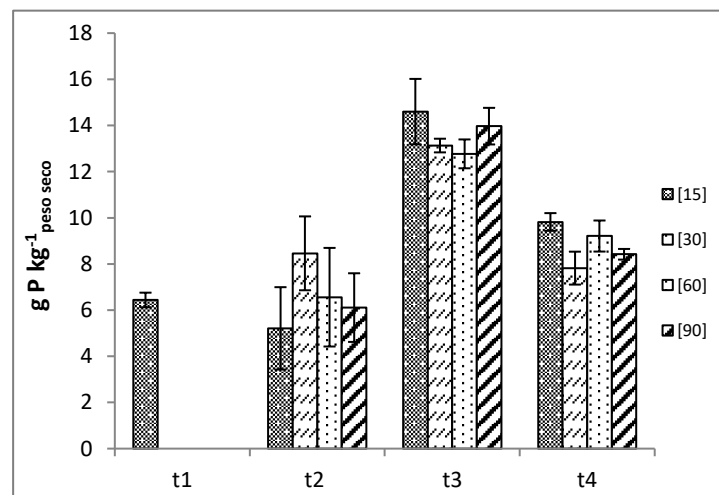


**Figura 3.25** – Concentração de magnésio no grão e respetivo erro padrão ( $n = 2$ ), para cada concentração referente à última colheita. A letra *a* indica que não existem diferenças significativas entre as concentrações estudadas.

Verificou-se assim que o incremento de nutrientes na solução nutritiva não afetou de forma significativa a acumulação de magnésio no grão. Colateralmente, considerando que a concentração de magnésio adequada nos tecidos da maioria das plantas vasculares oscila em torno de 1 - 2 g kg<sup>-1</sup> peso seco (Raven *et al.*, 2005), os resultados obtidos neste estudo integram-se em todos os tratamentos no intervalo considerado.

#### 3.1.2.1.2.4 Fósforo

Na raiz, os teores de fósforo nos diferentes tratamentos, em cada tempo de colheita, não apresentaram variações significativas (Figura 3.26; Tabela 3.16). Considerando cada tratamento isoladamente observaram-se diferenças significativas ao longo das diferentes colheitas, contudo para todos os casos os teores de fósforo mais elevados situaram-se na terceira colheita. A concentração de nutrientes ao longo dos diferentes tratamentos não afetou de forma significativa a concentração de fósforo na raiz.



**Figura 3.26** – Concentração de fósforo na raiz e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada concentração e colheita.

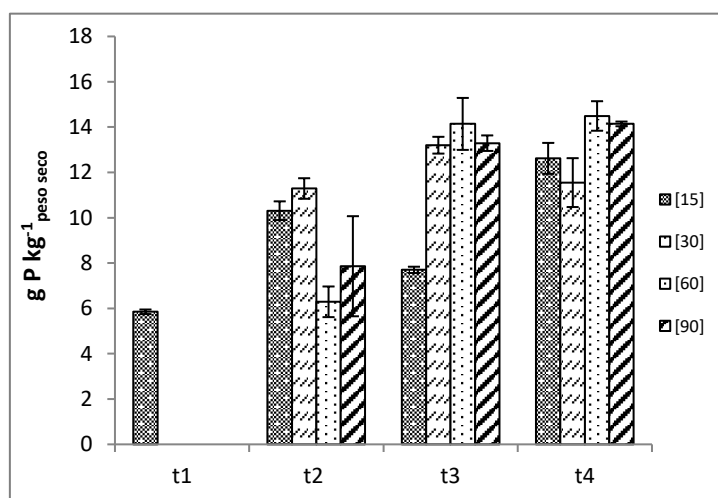
**Biofortificação de trigo duro (*Triticum durum*) em ferro, e seriação de parâmetros de qualidade para fabrico industrial de massas alimentícias**

**Tabela 3.16** – Média da concentração de fósforo, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da concentração de fósforo na raiz ( $\text{g kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. A letra *a* indica que não existem diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s*, *t* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
t1	6,44 ± 0,316 (s, t)	---	---	---
t2	5,21 ± 1,784 (a, t)	8,46 ± 1,600 (a, s)	6,56 ± 2,136 (a, s)	6,11 ± 1,487 (a, s)
t3	14,60 ± 1,417 (a, r)	13,13 ± 0,296 (a, r)	12,77 ± 0,625 (a, r)	13,97 ± 0,793 (a, r)
t4	9,82 ± 0,383 (a, s)	7,82 ± 0,713 (a, s)	9,21 ± 0,673 (a, r, s)	8,42 ± 0,231 (a, s)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

Na parte aérea ocorreram variações significativas entre os tratamentos e, para cada caso, entre os diferentes tempos de colheita (Figura 3.27; Tabela 3.17). Entre os diferentes tratamentos os teores de fósforo foram significativamente mais elevados na terceira ou quarta colheita. Destacaram-se as concentrações de fósforo nos tratamentos 60 mL e 90 mL, na terceira e quarta colheita.



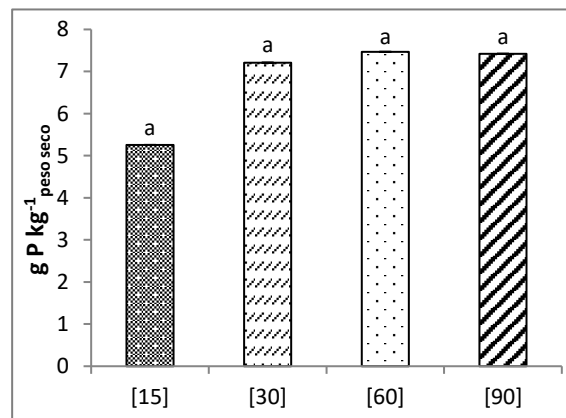
**Figura 3.27** – Concentração de fósforo na parte aérea e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada concentração e colheita.

**Tabela 3.17** – Média da concentração de fósforo, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração de fósforo na parte aérea ( $\text{g kg}^{-1}$  peso seco) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada tempo de colheita. As letras *r*, *s*, *t* indicam diferenças significativas entre os vários tempos de colheita, para cada tratamento.

Colheita	[15]	[30]	[60]	[90]
t1	5,85 ± 0,101 (t)	---	---	---
t2	10,31 ± 0,413 (a, b, r, s)	11,29 ± 0,453 (a, r)	6,29 ± 0,676 (c, s)	7,86 ± 2,208 (b, c, s)
t3	7,70 ± 0,139 (b, s, t)	13,20 ± 0,370 (a, r)	14,14 ± 1,147 (a, r)	13,29 ± 0,342 (a, r)
t4	12,62 ± 0,682 (a, b, r)	11,55 ± 1,078 (b, r)	14,49 ± 0,652 (a, r)	14,14 ± 0,104 (a, b, r)

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

De acordo com Bergmann (1992) e Marschner (1995) os teores médios de fósforo na parte aérea oscilam entre 2,6 - 3,1  $\text{g kg}^{-1}$  peso seco. Também Raven *et al.* (2005) consideraram que, na ausência de *stress*, a concentração de fósforo nos tecidos da maioria das plantas vasculares deve oscilar em torno de 2  $\text{g kg}^{-1}$  peso seco. Estes autores propõem assim valores inferiores face aos resultados obtidos (Figura 3.27; Tabela 3.17), contudo, a utilização de diferentes genótipos e de plantas em diferentes fases de crescimento submetidas a diferentes condições ambientais poderão estar na base destas diferenças.



**Figura 3.28** – Concentração de fósforo no grão e respetivo erro padrão ( $n = 2$ ), para cada concentração referente à última colheita. A letra *a* indica que não existem diferenças significativas entre as concentrações estudadas.

No grão, os teores de fósforo não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, tendo oscilado entre 5,26 - 7,47  $\text{g kg}^{-1}$  peso seco (Figura 3.28). Constatou-se assim que, também neste caso, o incremento de nutrientes na solução nutritiva não afetou de forma significativa a acumulação de fósforo no grão.



### **3.1.2.2. Taxas de acumulação total**

#### **3.1.2.2.1 Ferro**

Na raiz, a acumulação total média de ferro oscilou nos tratamentos: 15 mL, entre 8,9 - 25,9 µg; 30 mL, entre 54,3 - 93,7 µg; 60 mL, entre 26,4 - 261,7 µg; 90 mL, entre 116,2 - 378,8 µg (Tabela 3.18).

Na parte aérea, a acumulação total média de ferro oscilou, nos tratamentos: 15 mL, entre 7,7 - 310,0 µg; 30 mL, entre 218,7 - 306,7 µg; 60 mL, entre 125,5 - 291,6 µg; 90 mL, entre 306,4 - 390,5 µg (Tabela 3.18).

Entre os tratamentos 15 mL e 90 mL observou-se o aumento progressivo dos valores máximos de acumulação de ferro na raiz e parte aérea, que decorreu do aumento da biomassa e da concentração nos tecidos. Verificou-se ainda, que no grão a acumulação total de ferro oscilou entre 214,3 - 838,1 µg, prevalecendo teores mais elevados no tratamento 30 mL, aspeto que resultou da existência de um peso seco mais elevado (Tabela 3.18).

**Tabela 3.18** – Acumulação total de ferro referente à raiz, parte aérea e grão (n = 3), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.

Colheita	Tratamentos	Acumulação total de ferro (µg)		
		Raiz	Parte aérea	Grão
t1	Controlo	8,9	7,7	---
t2	[15]	23,5	189,8	---
	[30]	93,7	236,5	
	[60]	26,4	125,5	
	[90]	116,2	390,5	
t3	[15]	20,0	99,9	---
	[30]	54,3	306,7	
	[60]	119,6	291,6	
	[90]	378,8	306,4	
t4	[15]	25,9	310,0	214,3
	[30]	75,6	218,7	838,1
	[60]	261,7	156,4	376,9
	[90]	282,5	330,5	323,5

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

### 3.1.2.2.2 Cobre

Na raiz, a acumulação total média de cobre variou nos tratamentos (Tabela 3.19): 15 mL, entre 1,2 - 16,2 µg; 30 mL, entre 16,4 - 34,7 µg; 60 mL, entre 14,9 - 42,0 µg; 90 mL, entre 34,7 - 40,6 µg.

Observou-se ainda a acumulação total média de cobre que na parte aérea também oscilou nos tratamentos (Tabela 3.19): 15 mL, entre 1,5 - 45,5 µg; 30 mL, entre 74,4 - 105,8 µg; 60 mL, entre 83,1 - 110,3 µg; 90 mL, entre 57,1 - 136,7 µg. No grão a acumulação de cobre oscilou entre 41,3 - 176,8 µg (Tabela 3.19).

Entre os tratamentos 15 mL e 90 mL foi possível constatar o aumento progressivo dos valores máximos de acumulação de cobre na raiz e parte aérea, que decorreu particularmente do aumento da biomassa. Os teores mais elevados deste elemento no grão verificaram-se no tratamento 30 mL, aspeto que também neste caso resultou da existência de um maior peso seco.

**Tabela 3.19** – Acumulação total de cobre referente à raiz, parte aérea e grão (n = 3), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.

Colheita	Tratamentos	Acumulação total de cobre (µg)		
		Raiz	Parte aérea	Grão
t1	Controlo	1,2	1,5	---
t2	[15]	8,1	45,5	---
	[30]	16,4	104,3	
	[60]	14,9	83,9	
	[90]	34,7	92,8	
t3	[15]	16,1	36,1	---
	[30]	20,6	74,4	
	[60]	42,0	110,3	
	[90]	40,6	57,1	
t4	[15]	16,2	38,1	41,3
	[30]	34,7	105,8	176,8
	[60]	30,6	83,1	70,7
	[90]	36,2	136,7	48,5

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

### **3.1.2.2.3 Manganês**

Na raiz, a acumulação total média de manganês variou nos tratamentos (Tabela 3.20): 15 mL, entre 2,0 - 11,6 µg; 30 mL, entre 16,2 - 24,5 µg; 60 mL, entre 42,9 - 54,7 µg; 90 mL, entre 59,4 - 147,0 µg.

Na parte aérea a acumulação total média de manganês oscilou nos tratamentos (Tabela 3.20): 15 mL, entre 4,8 - 92,5 µg; 30 mL, entre 202,6 - 426,7 µg; 60 mL, entre 421,8 - 2285,4 µg; 90 mL, entre 995,9 - 1409,9 µg. No grão, a acumulação de manganês variou entre 142,9 - 863,6 µg (Tabela 3.20).

Entre os tratamentos 15 mL e 90 mL foi ainda possível verificar o aumento progressivo dos valores máximos de acumulação de manganês na raiz e parte aérea que decorreu do aumento da biomassa e da concentração nos tecidos. No grão, o teor mais elevado de manganês verificou-se no tratamento 30 mL, aspeto que, tal como apontado anteriormente, esteve associado um maior peso seco.

**Tabela 3.20** – Acumulação total de manganês referente à raiz, parte aérea e grão (n = 3), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.

Colheita	Tratamentos	Acumulação total de manganês (µg)		
		Raiz	Parte aérea	Grão
t1	Controlo	2,0	4,8	---
	[15]	9,0	62,5	
t2	[30]	21,5	214,6	---
	[60]	46,3	421,8	
	[90]	94,8	1409,9	
t3	[15]	11,6	38,2	
	[30]	16,2	202,6	---
	[60]	54,7	427,5	
	[90]	59,4	1338,3	
t4	[15]	8,1	92,5	142,9
	[30]	24,5	426,7	863,6
	[60]	42,9	2285,4	677,8
	[90]	147,0	995,9	453,0

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

### **3.1.2.2.4 Zinco**

Na raiz, a acumulação total média de zinco oscilou nos tratamentos (Tabela 3.21): 15 mL, entre 12,4 - 105,7 µg; 30 mL, entre 57,6 - 92,5 µg; 60 mL, entre 31,8 - 95,7 µg; 90 mL, entre 55,4 - 82,6 µg.

Na parte aérea a acumulação total média de zinco também variou nos tratamentos (Tabela 3.21): 15 mL, entre 11,0 - 932,5 µg; 30 mL, entre 1150,0 - 1631,2 µg; 60 mL, entre 349,3 - 1585,5 µg; 90 mL, entre 722,7 - 1494,5 µg. No grão, a acumulação de zinco variou entre 557,6 - 2098,3 µg (Tabela 3.21).

Entre os tratamentos 15 mL e 90 mL foi ainda possível constatar o aumento progressivo dos valores máximos da acumulação de zinco na raiz e parte aérea que decorreu do aumento da concentração nos tecidos. Os teores mais elevados de zinco no grão verificaram-se no tratamento 30 mL, aspeto que decorreu de um maior peso seco.

**Tabela 3.21** – Acumulação total de zinco referente à raiz, parte aérea e grão (n = 3), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.

Colheita	Tratamentos	Acumulação total de zinco (µg)		
		Raiz	Parte aérea	Grão
t1	Controlo	12,4	11,0	---
t2	[15]	50,0	656,1	---
	[30]	81,4	1150,0	
	[60]	31,8	349,3	
	[90]	61,3	775,1	
t3	[15]	105,7	883,7	---
	[30]	92,5	1320,7	
	[60]	95,7	1006,2	
	[90]	82,6	722,7	
t4	[15]	79,6	932,5	557,6
	[30]	57,6	1631,2	2098,3
	[60]	43,4	1585,5	1043,6
	[90]	55,4	1494,5	645,4

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

### 3.1.2.2.5 Cálcio

Na raiz, a acumulação total média de cálcio oscilou nos tratamentos (Tabela 3.22): 15 mL, entre 0,3 - 3,7 mg; 30 mL, entre 6,1 - 11,4 mg; 60 mL, entre 2,0 - 14,4 mg; 90 mL, entre 5,9 - 22,5 mg.

Na parte aérea, a acumulação total média de cálcio também variou nos diferentes tratamentos (Tabela 3.22): 15 mL, entre 0,2 - 35,9 mg; 30 mL, entre 20,2 - 70,0 mg; 60 mL, entre 6,2 - 91,8 mg; 90 mL, entre 16,3 - 238,3 mg. No grão a acumulação de cálcio oscilou entre 2,7 - 11,1 mg (Tabela 3.22).

Entre os tratamentos 15 mL e 90 mL foi possível constatar o aumento progressivo dos valores máximos de acumulação de cálcio na raiz e parte aérea, que decorreu do aumento da biomassa e da concentração nos tecidos. Os teores mais elevados deste elemento no grão verificaram-se no tratamento 30 mL, aspeto que também neste caso resultou da existência de um maior peso seco.

**Tabela 3.22** - Acumulação total de cálcio referente à raiz, parte aérea e grão (n = 3), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.

Colheita	Tratamentos	Acumulação total de cálcio (mg)		
		Raiz	Parte aérea	Grão
t1	Controlo	0,3	0,2	---
	[15]	1,0	6,2	
t2	[30]	6,1	20,2	---
	[60]	2,0	6,2	
	[90]	5,9	16,3	
t3	[15]	2,2	16,0	
	[30]	8,2	70,0	---
	[60]	8,3	56,9	
	[90]	15,3	95,6	
t4	[15]	3,7	35,9	2,7
	[30]	11,4	68,0	11,1
	[60]	14,4	91,8	6,0
	[90]	22,5	238,3	6,8

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

### 3.1.2.2.6 Potássio

A acumulação total média de potássio na raiz variou nos tratamentos (Tabela 3.23): 15 mL, entre 2,9 - 32,6 mg; 30 mL, entre 31,4 - 40,8 mg; 60 mL, entre 11,1 - 44,1 mg; 90 mL, entre 15,9 - 56,7 mg.

Detetou-se ainda que a acumulação total média de potássio na parte aérea oscilou nos tratamentos (Tabela 3.23): 15 mL, entre 4,5 - 344,4 mg; 30 mL, entre 491,6 - 611,5 mg; 60 mL, entre 196,7 - 612,7 mg; 90 mL, entre 467,7 - 754,8 mg. No grão, a acumulação de potássio oscilou entre 25,6 - 157,6 mg (Tabela 3.23).

Entre os tratamentos 15 mL e 90 mL foi ainda possível verificar o aumento progressivo dos valores máximos de acumulação de potássio na raiz e parte aérea que decorreu do aumento da biomassa e da concentração nos tecidos. Os teores mais elevados de potássio no grão foram obtidos no tratamento 30 mL, aspeto que resultou, também neste caso, da existência de um maior peso seco.

**Tabela 3.23** – Acumulação total de potássio referente à raiz, parte aérea e grão (n = 3), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.

Colheita	Tratamentos	Acumulação total de potássio (mg)		
		Raiz	Parte aérea	Grão
t1	Controlo	2,9	4,5	---
	[15]	10,9	214,4	
t2	[30]	31,4	535,5	---
	[60]	11,1	196,7	
	[90]	31,5	467,7	
t3	[15]	32,6	256,0	---
	[30]	37,8	611,5	
	[60]	44,1	612,7	
	[90]	56,7	754,8	
t4	[15]	16,5	344,4	25,6
	[30]	40,8	491,6	157,6
	[60]	18,9	275,1	52,2
	[90]	15,9	652,3	57,0

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

### **3.1.2.2.7 Magnésio**

A acumulação total média de magnésio na raiz variou nos tratamentos (Tabela 3.24): 15 mL, entre 0,1 - 0,3 mg; 30 mL, entre 0,3 - 0,5 mg; 60 mL, entre 0,2 - 0,4 mg; 90 mL, entre 0,3 - 0,4 mg.

Na parte aérea a acumulação total média de magnésio oscilou nos tratamentos (Tabela 3.24): 15 mL, entre 0,2 - 7,0 mg; 30 mL, entre 6,9 - 11,8 mg; 60 mL, entre 4,5 - 7,3 mg; 90 mL, entre 7,4 - 14,6 mg. Entre os tratamentos 15 mL e 90 mL foi possível constatar o aumento progressivo dos valores máximos de acumulação de magnésio na raiz e parte aérea que decorreu do aumento da biomassa e da concentração nos tecidos. No grão, a acumulação de magnésio oscilou entre 7,0 - 34,9 mg (Tabela 3.24). Os teores mais elevados de magnésio no grão obtiveram-se no tratamento 30, aspeto que resultou da existência de um maior peso seco.

**Tabela 3.24** – Acumulação total de magnésio referente à raiz, parte aérea e grão (n = 3), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.

Colheita	Tratamentos	Acumulação total de magnésio (mg)		
		Raiz	Parte aérea	Grão
t1	Controlo	0,1	0,2	---
	[15]	0,2	3,2	
t2	[30]	0,3	6,9	
	[60]	0,2	4,5	---
	[90]	0,4	10,8	
t3	[15]	0,3	2,9	
	[30]	0,3	11,8	
	[60]	0,4	6,7	---
	[90]	0,3	7,4	
t4	[15]	0,2	7,0	7,0
	[30]	0,5	10,3	34,9
	[60]	0,3	7,3	11,8
	[90]	0,4	14,6	11,3

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.

### **3.1.2.2.8 Fósforo**

Na raiz, a acumulação total média de fósforo oscilou nos tratamentos (Tabela 3.25): 15 mL, entre 0,5 - 7,0 mg; 30 mL, entre 6,4 - 8,7 mg; 60 mL, entre 2,3 - 10,1 mg; 90 mL, entre 5,7 - 12,4 mg.

Na parte aérea a acumulação total média de fósforo variou nos tratamentos (Tabela 3.25): 15 mL, entre 1,0 - 56,3 mg; 30 mL, entre 86,8 - 102,9 mg; 60 mL, entre 21,3 - 99,9 mg; 90 mL, entre 64,7 - 156,8 mg. No grão, a acumulação de fósforo oscilou entre 25,6 - 131,4 mg (Tabela 3.25).

Entre os tratamentos 15 mL e 90 mL foi ainda possível constatar o aumento progressivo dos valores máximos de acumulação de fósforo na raiz e parte aérea que decorreu do aumento da biomassa. No grão os teores mais elevados de fósforo verificaram-se no tratamento 30 mL, aspeto que resultou da existência de um maior peso seco.

**Tabela 3.25** – Acumulação total de fósforo referente à raiz, parte aérea e grão (n = 3), considerando a biomassa total de cada estrutura, para as diferentes amostras nas variáveis concentração e colheita.

Colheita	Tratamentos	Acumulação total de fósforo (mg)		
		Raiz	Parte aérea	Grão
t1	Controlo	0,5	1,0	---
t2	[15]	2,4	41,9	---
	[30]	6,4	86,8	
	[60]	2,3	21,3	
	[90]	5,7	64,7	
t3	[15]	7,0	24,9	---
	[30]	8,7	96,2	
	[60]	10,1	99,9	
	[90]	12,4	98,1	
t4	[15]	4,2	56,3	25,6
	[30]	8,3	102,9	131,4
	[60]	6,4	82,2	56,0
	[90]	7,1	156,8	51,5

\* Dias após a germinação: t1= 16, t2= 70, t3= 92, t4= 126.



### 3.1.2.3 Cinética de Absorção e Translocação

#### 3.1.2.3.1 Micronutrientes

O genótipo estudado revelou um decréscimo da taxa de absorção média diária de cobre, zinco, ferro e manganês da segunda para a terceira colheita e subsequente aumento da terceira para a quarta colheita. A exceção prendeu-se com o tratamento 60 mL para o cobre, com os tratamentos 15 mL e 60 mL no caso do zinco, com os tratamentos 60 mL e 90 mL para o ferro, e com o tratamento 90 mL para o manganês (Figura 3.29A). Foi ainda possível constatar um incremento da absorção média diária e da respetiva translocação para a parte aérea ao longo dos diferentes tratamentos e nos diferentes tempos de colheita. De facto, verificou-se que o incremento de cobre para os tratamentos 15 mL, 30 mL, 60 mL e 90 mL foi de 26,5 %, 10,8 %, 11,0 % e 25,2 %, respetivamente. Relativamente ao zinco também se verificou um incremento progressivo para os tratamentos 15 mL, 30 mL, 60 mL e 90 mL de 47,9 %, 5,0 %, 7,1 % e 7,8 %, respetivamente. Relativamente ao ferro, observou-se um incremento para os tratamentos 15 mL, 30 mL e 90 mL de 49,0 %, 21,7 % e 25,1 %, respetivamente. Quanto ao manganês também se verificou um crescimento para os tratamentos 15 mL, 30 mL e 60 mL de 26,2 %, 7,2 % e 9,9 %, respetivamente (Figura 3.29B).

Tendo em conta todos os tratamentos em cada período experimental, verificou-se que (Figura 3.29A; Figura 3.29B) as taxas de absorção e translocação de cobre manteve padrões similares ( $t_2 > t_4 > t_3 > t_1$ ) para o tratamento 15 mL. Os restantes tratamentos apresentaram diferentes padrões entre si. As taxas de absorção de zinco revelaram diferentes padrões entre os períodos experimentais ( $t_4 > t_3 > t_2 > t_1$  para os tratamentos 15 mL e 60 mL e  $t_4 > t_2 > t_3$  para os tratamentos 30 mL e 90 mL; adicionalmente,  $t_3$  e  $t_4$  obtiveram valores similares e aumentaram, respetivamente), contudo as taxas de translocação para a parte aérea após  $t_1$  não variaram substancialmente (Figura 3.29A; Figura 3.29B). Os padrões das taxas de absorção de ferro permaneceram semelhantes ao verificado para o cobre para o tratamento 30 mL, no entanto verificaram-se tendências antagonistas para os tratamentos 60 mL e 90 mL ( $t_4 > t_3 > t_2$  e  $t_2 > t_3 > t_4$ , respetivamente). As taxas de translocação de ferro para a parte aérea seguiram sequências diferentes nos tratamentos 15 mL ( $t_4 > t_2 > t_3$ ) e 90 mL ( $t_2 > t_4 > t_3$ ). Padrões divergentes verificaram-se ainda nos tratamentos 30 mL e 60 mL ( $t_4 > t_3 > t_2$  e  $t_2 > t_3 > t_4$ , respetivamente). Relativamente ao manganês, as taxas de absorção nos tratamentos 15 mL, 30 mL e 60 mL mantiveram-se semelhantes ( $t_4 > t_2 > t_3 > t_1$ ), contudo o tratamento 90 mL decresceu a partir de  $t_2$  (Figura 3.29A). As taxas de translocação de manganês para a parte aérea demonstraram menores variações (com exceção do tratamento 15 mL em  $t_1$  e  $t_4$ ) (Figura 3.29B).

Considerando que ocorreu um incremento da taxa de absorção e translocação ao longo do ciclo da planta para os diferentes tratamentos, estes dados sugerem que prevalece a

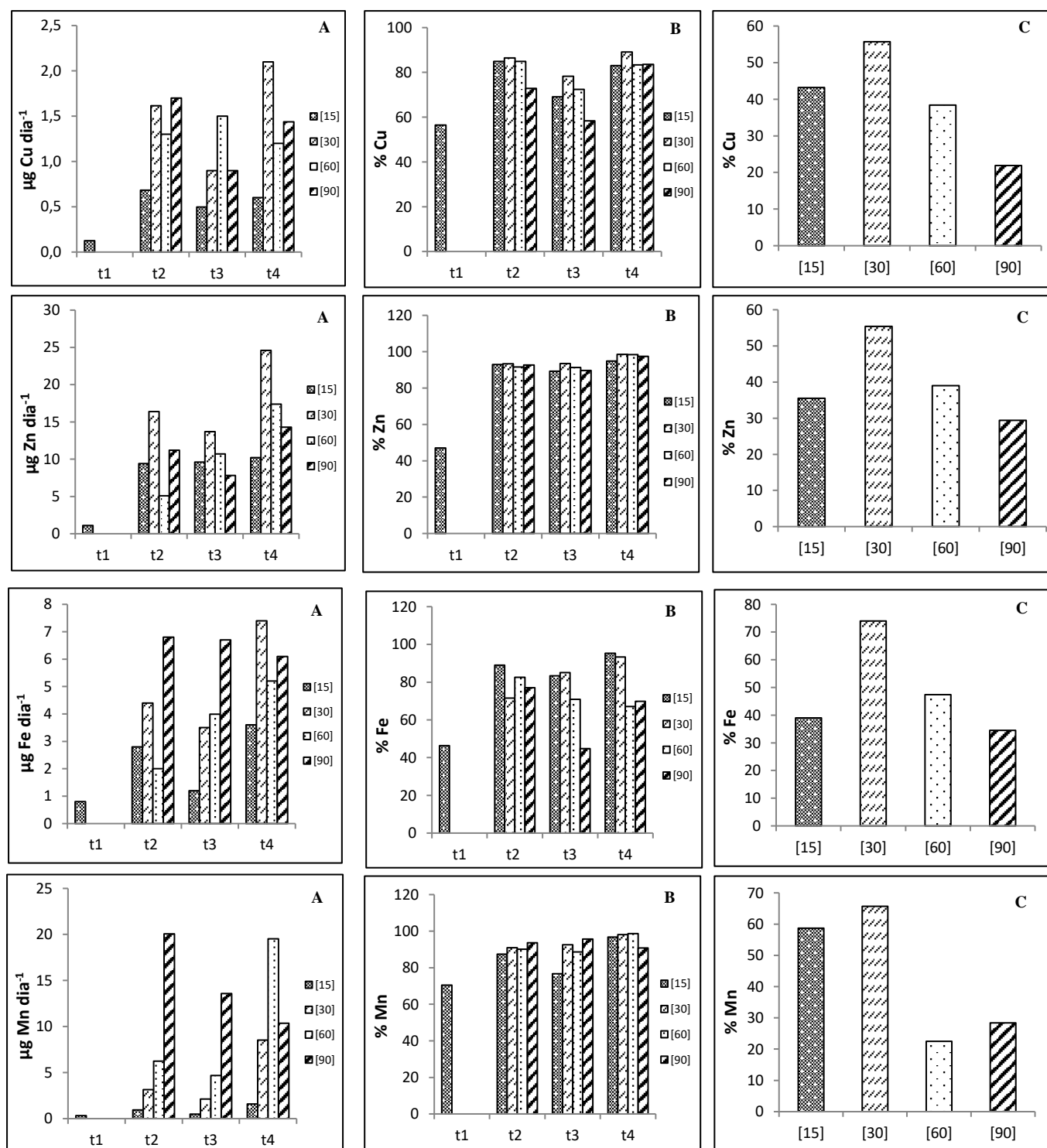
manutenção de um processo regulatório para as concentrações de ferro, cobre, zinco e manganês aplicadas na solução nutritiva, envolvendo a mobilização destes elementos minerais, nomeadamente para a parte aérea.

Neste enquadramento aponte-se que os mecanismos de absorção e translocação de ferro nas plantas têm sido alvo de diversos estudos, pois constituem os processos chave no fornecimento deste elemento para as plantas (Chaney *et al.*, 1972; Moore, 1972; Tiffin, 1977; Mengel e Kirkby, 1978; Tinker, 1981). Quantidades excessivas de metais pesados, em particular de manganês, níquel e cobalto, também parecem causar uma redução na absorção e translocação de ferro e, conseqüentemente, uma diminuição da clorofila (Chaney *et al.*, 1972). Ao estudarem os efeitos do zinco (50 e 300 mg L<sup>-1</sup>) em *Triticum aestivum* cv. Zura em cultura hidropónica, Glińska *et al.* (2016) observaram que no caso do tratamento com 50 mg L<sup>-1</sup> as concentrações de cobre, ferro e manganês são sempre mais elevadas na raiz do que na parte aérea e comparativamente com as plantas controlo apresentam concentrações inferiores de cobre, ferro e zinco na parte aérea e concentrações mais elevadas de cobre e ferro na raiz. Com o tratamento de 300 mg L<sup>-1</sup> as concentrações na parte aérea decresceram para qualquer dos elementos enquanto que aumentaram de modo acentuado nas raízes para o caso do cobre (4 vezes) e ferro (20,5 vezes), indicando que a translocação para os órgãos aéreos é fortemente afectada.

Diversos estudos evidenciam que a absorção de manganês é um processo metabolicamente controlado, aparentemente de forma similar a outras espécies, tais como o magnésio e o cálcio (Tiffin, 1977; Tinker, 1981). Note-se contudo que a concentração de manganês oscila consoante a parte da planta e período vegetativo (Heenan e Campbell, 1980).

Independentemente da concentração de cobre, zinco, ferro e manganês no grão (que foi máxima no tratamento 30 mL, 60 mL, 60 mL e 60 mL respetivamente), a maior acumulação destes elementos minerais ocorreu no tratamento 30 mL visto que a produção de massa seca foi superior (Figura 3.29C).

**Biofortificação de trigo duro (*Triticum durum*) em ferro, e seriação de parâmetros de qualidade para fabrico industrial de massas alimentícias**



**Figura 3.29** - Taxa de absorção média diária (A), taxa de translocação diária média para cada concentração e colheita (B) e taxa de mobilização média para o grão para cada concentração (C).

A absorção total de cada nutriente foi determinada numa base diária, multiplicando a biomassa média de cada órgão da planta pela concentração média do nutriente, seguido da soma destes valores. A translocação para a parte aérea de cada elemento considerou a divisão do produto da média da biomassa da parte aérea e a concentração média do nutriente pela absorção total. A taxa de mobilização de cada elemento para o grão foi calculada dividindo o produto da biomassa do grão e o conteúdo do elemento pela absorção total.

### 3.1.2.3.2 Macronutrientes

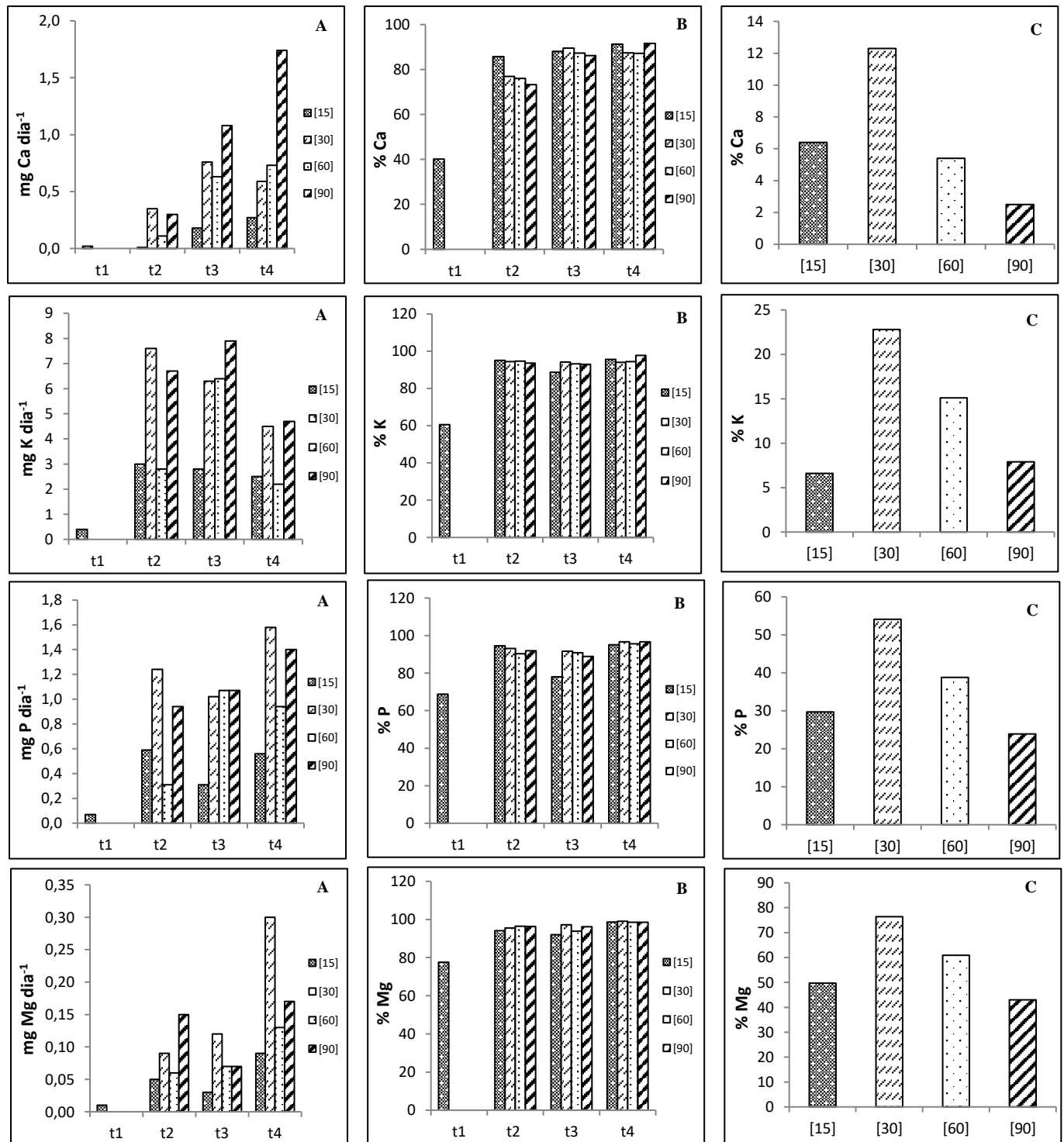
O genótipo estudado revelou um incremento da taxa de absorção média diária de cálcio ao longo do desenvolvimento vegetativo. A única exceção prende-se com o tratamento 30 mL. Quanto ao potássio verificou-se um decréscimo da taxa de absorção média diária ao longo do desenvolvimento vegetativo, tendo como exceção os tratamentos 60 mL e 90 mL. Observou-se ainda um decréscimo da taxa de absorção média diária de fósforo da segunda para a terceira colheita e subsequente aumento da terceira para a quarta colheita, com exceção dos tratamentos 60 mL e 90 mL. Relativamente ao magnésio verificou-se um incremento da taxa de absorção média diária, tendo como exceção os tratamentos 15 mL e 90 mL (Figura 3.30A).

No caso particular do cálcio verificou-se um incremento da absorção média diária e da respetiva translocação para a parte aérea ao longo dos diferentes tratamentos e nos diferentes tempos de colheita. De facto, verificou-se que o incremento de cálcio para os tratamentos 15 mL, 30 mL, 60 mL e 90 mL foi de 51,2 %, 12,6 %, 11,3 % e 18,3 %, respetivamente. Quanto ao potássio verificou-se para os tratamentos 15 mL e 90 mL um crescimento de 35,1 % e 4,1 %, respetivamente. Relativamente ao fósforo, observou-se um incremento para os tratamentos 15 mL, 30 mL, 60 mL e 90 mL de 26,3 %, 3,5 %, 5,3 % e 4,8 %, respetivamente. Quanto ao magnésio também se verificou uma taxa de translocação diária média para os tratamentos 15 mL, 30 mL, 60 mL e 90 mL de 21,1 %, 3,5 %, 2,0 % e 2,3 %, respetivamente (Figura 3.30B).

As taxas de absorção de cálcio entre t2 e t4 aumentaram progressivamente nos tratamentos 15 mL, 60 mL e 90 mL, ainda que no tratamento 30 mL tenha decrescido ligeiramente entre t3 e t4 (Figura 3.30A). As taxas de absorção do potássio também decresceram progressivamente entre t2 e t4 nos tratamentos 15 mL e 30 mL, contudo os restantes tratamentos seguiram o padrão  $t3 > t2 > t4$ . Nos tratamentos 15 mL, 30 mL e 60 mL a taxa de absorção de fósforo seguiu o padrão  $t2 > t4 > t3 > t1$ ,  $t4 > t2 > t3$  e  $t3 > t4 > t2$ , respetivamente, enquanto que o tratamento 90 mL sofreu um incremento a partir de t1 (Figura 3.30A). As taxas de absorção do magnésio aumentaram progressivamente a partir de t1 nos tratamentos 30 mL e 60 mL, no entanto os restantes tratamentos seguiram um padrão diferente  $t4 > t2 > t3$  (Figura 3.30A). As taxas de translocação para a parte aérea de todos os macronutrientes (Figura 3.30B) demonstraram valores mínimos em t1, contudo nos restantes períodos experimentais os padrões foram bastante similares (exceto em t2 para o cálcio e no tratamento 15 mL em t3 para o fósforo).

Os resultados obtidos indicam que este processo não é afetado pela concentração de nutrientes em cada momento, visto não subsistirem diferenças substanciais. Independentemente da concentração de cálcio, potássio, fósforo e magnésio no grão (que foi máxima no tratamento 90 mL, 30 mL, 60 mL e 30 mL respetivamente), a maior acumulação destes elementos minerais ocorreu no tratamento 30 mL visto que a produção de massa seca foi superior (Figura 3.30C).

**Biofortificação de trigo duro (*Triticum durum*) em ferro, e seriação de parâmetros de qualidade para fabrico industrial de massas alimentícias**



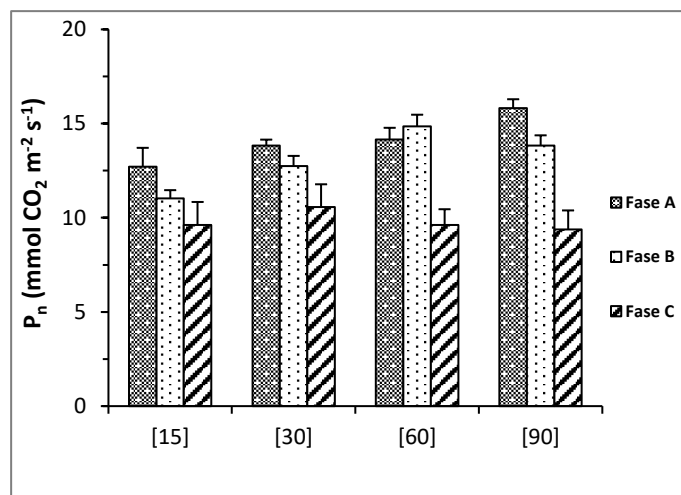
**Figura 3.30** - Taxa de absorção média diária (A), taxa de translocação diária média para cada concentração e colheita (B) e taxa de mobilização média para o grão para cada concentração (C). A absorção total de cada nutriente foi determinada numa base diária, multiplicando a biomassa média de cada órgão da planta pela concentração média do nutriente, seguido da soma destes valores. A translocação para a parte aérea de cada elemento considerou a divisão do produto da média da biomassa da parte aérea e a concentração média do nutriente pela absorção total. A taxa de mobilização de cada elemento para o grão foi calculada dividindo o produto da biomassa do grão e o conteúdo do elemento pela absorção total.

### 3.1.3 Cinética de síntese de fotoassimilados

A taxa fotossintética líquida, no tratamento 15 mL, não variou de forma significativa nos diferentes tempos de ensaio; por oposição, nos tratamentos 30 mL, 60 mL e 90 mL ocorreram valores progressivamente menores, que foram significativamente diferentes na Fase C (Figura 3.31; Tabela 3.26). Considerando que, relativamente ao controlo (tratamento 15 mL), os restantes tratamentos apontaram para uma inibição progressiva da taxa fotossintética líquida, eventualmente os dados obtidos sugerem que um acréscimo na carga nutricional será responsável pela inibição detetada. Note-se, contudo, que, também no tratamento controlo ocorre um progressivo decréscimo, ainda que não significativo. Neste enquadramento, os dados poderão ainda sugerir que no decurso do ciclo de vida das plantas ocorre uma progressiva inibição da taxa fotossintética líquida. Por oposição, considerando que nas fases A e B de cada tratamento ocorreram aumentos significativos, os dados parecem indicar que o aumento da carga nutricional nas plantas incrementa a taxa fotossintética líquida. Já na fase C, a ausência de variações significativas, de novo sugere a emergência de um processo metabólico que irá conduzir a uma progressiva clorose e necrose foliar (Figura 3.31; Tabela 3.26).

Dias *et al.* (2009, 2010) estudaram o crescimento em estufa de sementes de trigo mole e duro, sob luz natural, com fotoperíodo variável entre 12 e 14 h, irradiância máxima de 1000  $\mu\text{mol Q m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e 40 – 60 % de humidade relativa. A taxa fotossintética líquida ( $P_n$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) foram avaliadas em cada tratamento, sob condições de estado fotossintético estacionário, após cerca de 2 h de exposição à luz, através da utilização de um sistema portátil de análise de gás por infravermelho. Este ensaio de biofortificação realizou-se em condições bastante similares comparativamente com o presente estudo. Estes autores consideraram que a taxa fotossintética líquida se situa entre 26,8 - 31,7  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , valores superiores aos obtidos no nosso estudo (Figura 3.31; Tabela 3.26). Também um estudo realizado por Lidon *et al.* (1993) com sementes de arroz crescidas em estufa verificaram que a taxa fotossintética líquida se situava entre 1,8 - 22,7  $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Neste enquadramento verificou-se que os resultados obtidos no nosso estudo (Figura 3.31; Tabela 3.26) não divergem de forma substancial desses valores. Acresce ainda que Lidon *et al.* (2015) efetuaram um estudo com sementes de trigo mole, variedade Roxo para subsequente crescimento numa câmara de crescimento, em condições ambientais controladas. As sementes foram submetidas a diversos tratamentos de adubação com aplicação de uma solução nutritiva completa. Este ensaio de biofortificação realizou-se em condições bastante similares comparativamente com o presente estudo. Neste ensaio a taxa fotossintética líquida sofreu um ligeiro incremento entre os diferentes tratamentos, sugerindo não ter sido alcançado nenhum limiar de toxicidade com a aplicação da solução nutritiva completa. Estes autores

verificaram que a taxa fotossintética líquida se situava entre 17 - 20 mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, valores apenas ligeiramente acima dos obtidos no nosso estudo.



**Figura 3.31** - Taxa fotossintética líquida dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.

**Tabela 3.26** – Média da taxa fotossintética líquida, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da taxa fotossintética líquida (mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a, b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r, s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

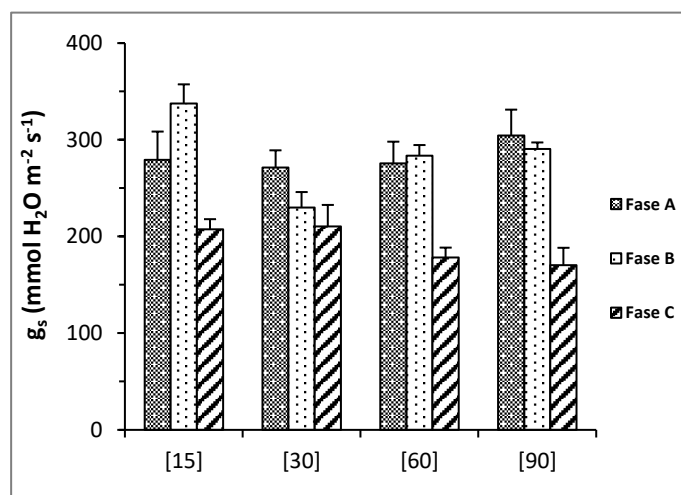
Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	12,7 ± 1,0 (b, r)	13,8 ± 0,3 (a, b, r)	14,2 ± 0,6 (a, b, r)	15,8 ± 0,5 (a, r)
<b>Fase B</b>	11,0 ± 0,4 (b, r)	12,8 ± 0,5 (a, b, r, s)	14,9 ± 0,6 (a, r)	13,8 ± 0,5 (a, b, r)
<b>Fase C</b>	9,6 ± 1,2 (a, r)	10,6 ± 1,2 (a, s)	9,6 ± 0,8 (a, s)	9,4 ± 1,0 (a, s)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

A condutância estomática, nas diferentes fases de ensaio, não variou de forma significativa no tratamento 30 mL; porém, nos tratamentos 15 mL, 60 mL e 90 mL ocorreram valores significativamente mais reduzidos na fase C (Figura 3.32; Tabela 3.27). Embora no tratamento 30 mL não tenham ocorrido alterações significativas, o acentuado decréscimo obtido na fase C, em todos os tratamentos, sugere o envolvimento do controlo estomático na definição das taxas fotossintéticas líquidas obtidas neste ensaio (Figura 3.31; Tabela 3.26). De facto, esta hipótese parece reforçar-se ainda na ausência de variações significativas na fase C em todos os tratamentos (Figura 3.32; Tabela 3.27). Note-se contudo que, enquanto na fase A a ausência de variações significativas sugere que não prevalecem alterações no comportamento estomático das plantas, na fase B tende a prevalecer uma tendência depressionária neste parâmetro fisiológico relativamente ao controlo, aspeto que poderá

indiciar o envolvimento de outros parâmetros que asseguram, neste contexto, a manutenção de taxas fotossintéticas líquidas mais elevadas (Figura 3.31; Tabela 3.26).

Dias *et al.* (2009, 2010) reportaram que a abertura estomática diminui a temperatura da folha através de um processo de evaporação que simultaneamente mantém o desempenho fotossintético em trigo mole e duro, tendo verificado ainda que a condutância estomática se situava entre 452 - 546 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Adicionalmente, Lidon *et al.* (2015) observaram em trigo mole, valores de condutância estomática entre 270 - 350 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, concluindo que as condições de biofortificação impostas não restringiram substancialmente este parâmetro fotossintético. Comparativamente com os dados de Dias *et al.* (2010) para trigo duro, os valores por nós obtidos são claramente inferiores sendo o nosso valor máximo 1,5 vezes inferior aos valores referidos por estes autores (Figura 3.32; Tabela 3.27). Este parâmetro fotossintético foi recentemente considerado um indicador de diferenças genotípicas na resposta de crescimento ao *stress* hídrico (Scotti-Campos *et al.*, 2015).



**Figura 3.32** – Condutância estomática dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.

**Tabela 3.27** – Média da condutância estomática, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da condutância estomática (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	279,2 ± 29,3 (a, r)	271,2 ± 17,9 (a, r)	275,8 ± 22,3 (a, r)	304,5 ± 26,7 (a, r)
<b>Fase B</b>	337,5 ± 19,8 (a, r)	230,0 ± 16,0 (b, r)	283,5 ± 11,1 (a, b, r)	290,5 ± 6,7 (a, b, r)
<b>Fase C</b>	207,5 ± 10,4 (a, s)	210,5 ± 22,1 (a, r)	178,3 ± 10,2 (a, s)	170,3 ± 18,0 (a, s)

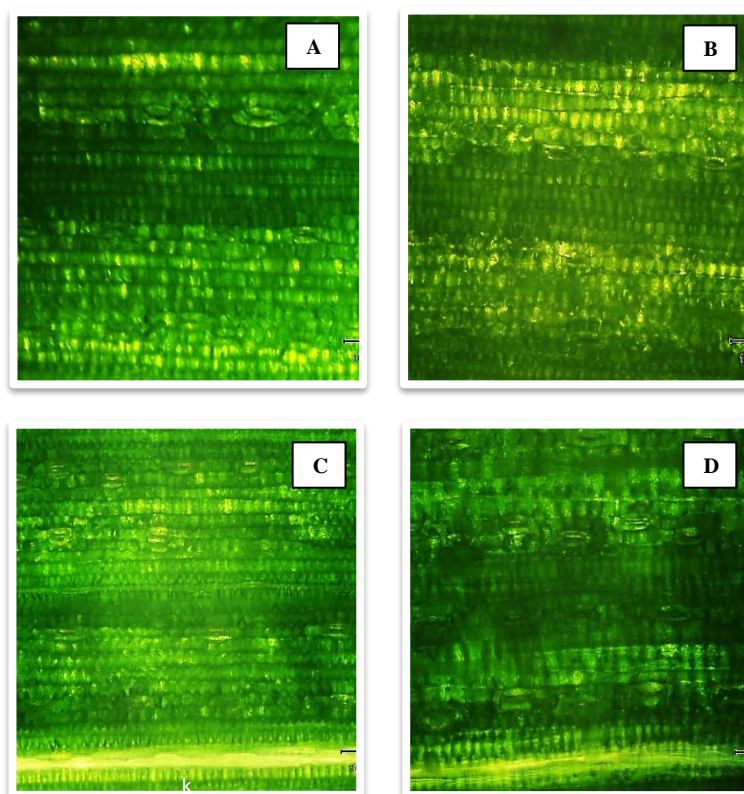
\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.



Neste contexto, efectuou-se ainda a contagem de estomas nas páginas adaxial e abaxial das folhas, adotando-se, como sistemas de contagem, linhas individuais e contagens totais por unidade de área (Figura 3.33; Tabela 3.28). Aos 71 dias após a germinação, a contagem de estomas não variou de forma significativa em cada tratamento nas diferentes páginas da folha, nem individualmente para cada tratamento.

**Tabela 3.28** – Média da contagem de estomas, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da contagem de estomas efetuada nas páginas adaxial e abaxial das folhas. A letra *a* indica ausência de diferenças significativas entre os tratamentos em cada página da folha. A letra *r* indica ausência de diferenças significativas entre as várias páginas da folha, para cada tratamento.

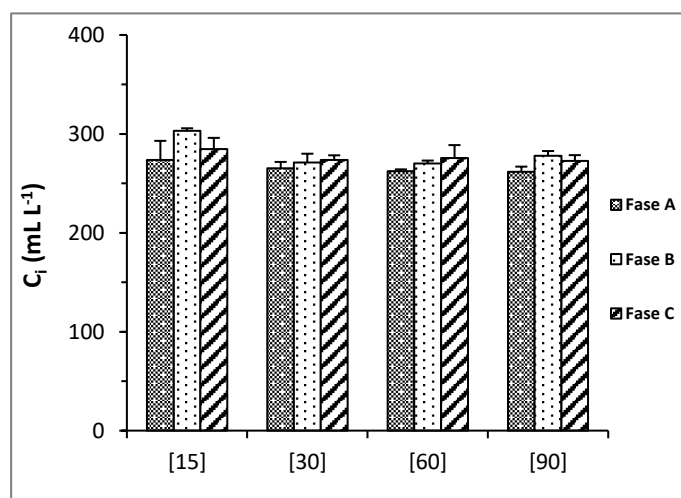
Tratamento	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>20 dias após a germinação (nº de estomas por mm<sup>2</sup>)</b>				
Página adaxial	72	78	70	84
Página abaxial	63	70	54	70
<b>71 dias após a germinação (nº de estomas por mm<sup>2</sup>)</b>				
Página adaxial	123 ± 12,000 (a, r)	123 ± 3,383 (a, r)	118 ± 9,735 (a, r)	118 ± 6,386 (a, r)
Página abaxial	116 ± 3,333 (a, r)	117 ± 12,706 (a, r)	127 ± 7,667 (a, r)	125 ± 4,359 (a, r)



**Figura 3.33** – Imagens ilustrativas da epiderme, contendo estomas, de uma amostra da folha bandeira de *Triticum durum*, variedade Marialva, obtida por microscopia ótica, para os diferentes tratamentos: 15 mL (A); 30 mL (B); 60 mL (C); 90 mL (D), 20 dias após a germinação (ampliação 10 x).

A concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  não variou de forma significativa em cada tratamento nas diferentes fases do ensaio, constatando-se assim a ausência de qualquer limitação (Figura 3.34; Tabela 3.29). Neste contexto, constatou-se que para cada tratamento, as variações na condutância estomática ( $g_s$ ) não afetaram negativamente as taxas fotossintéticas ao longo dos diferentes tempos de ensaio e nos diferentes tratamentos. Por oposição, verificou-se que, nas fases A e B, ocorreram variações significativas entre os tratamentos; na fase C não foram detetadas variações significativas para os diferentes tratamentos (Figura 3.34; Tabela 3.29). Note-se, contudo, que estes dados, correlacionam-se com a variação das taxas fotossintéticas líquidas.

Dias *et al.* (2009, 2010) concluíram que as reações fotoquímicas do metabolismo fotossintético do trigo duro apresentaram uma transferência de energia de elevada eficiência entre os centros de reação do fotossistema II, o que limitou a utilização de ATP no Ciclo de Calvin, justificando o incremento da concentração intercelular de  $\text{CO}_2$ . Estes autores verificaram ainda que a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  se situava entre 258 - 274  $\text{mL L}^{-1}$ . No nosso estudo os resultados obtidos (Figura 3.34; Tabela 3.29) também se situam na gama de valores verificados por esses autores.



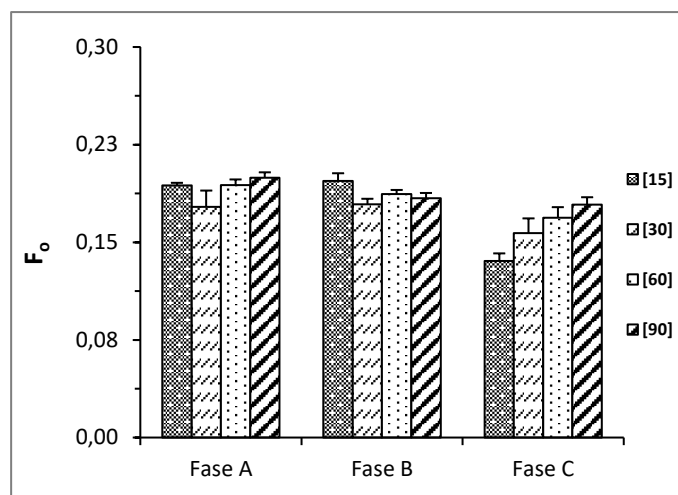
**Figura 3.34** – Concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão ( $n = 4$ ) para cada concentração e dia de ensaio.

**Tabela 3.29** – Média da concentração intercelular de CO<sub>2</sub>, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (mL L<sup>-1</sup>) para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. A letra *r* indica ausência de diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	273,5 ± 19,5 (a, r)	265,2 ± 6,4 (b, r)	262,3 ± 1,9 (b, r)	261,8 ± 5,2 (b, r)
<b>Fase B</b>	303,0 ± 2,7 (a, r)	271,0 ± 9,0 (b, r)	270,0 ± 3,0 (b, r)	278,0 ± 4,7 (a, b, r)
<b>Fase C</b>	284,5 ± 11,5 (a, r)	273,8 ± 4,6 (a, r)	275,8 ± 12,9 (a, r)	272,8 ± 5,8 (a, r)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

F<sub>0</sub> indicia a fluorescência inicial mínima, quando todos os centros de reação do PS II estão abertos e representa a fluorescência emitida pelas moléculas excitadas de Chl *a* das antenas numa fase prévia à migração dos excitões para os centros de reação (Krause e Weis, 1991). Em consequência, o rendimento da fluorescência de F<sub>0</sub> é independente dos eventos fotoquímicos (Krause e Weis, 1984; Walker, 1988), mas não da densidade inicial dos excitões no interior dos pigmentos do PS II (Lichtenthaler, 1988) nem das condições estruturais que afetam a probabilidade da transferência de energia de excitação entre os pigmentos da antena e os centros de reação dos fotossistemas I e II (Prange, 1986). Aumentos em F<sub>0</sub>, induzidos pelo calor, estão associados a alterações nas interações lípido-proteína causadas pelo aumento da fluidez dos lípidos das membranas tilacoidais a elevadas temperaturas (Berry e Bjorkman, 1980; Gounaris *et al.*, 1984; Sundby *et al.*, 1986). Por outro lado, a estabilidade do F<sub>0</sub> revela que os complexos das antenas não são afetados (Araus *et al.*, 1998). No âmbito da fase fotoquímica da fotossíntese, verificou-se que, considerando cada fase isoladamente, entre os diferentes tratamentos do nosso estudo não subsistiram variações significativas para F<sub>0</sub> (Figura 3.35; Tabela 3.30). Estes dados claramente apontam para a ausência de variações induzidas pela carga nutricional aplicada na solução nutritiva sobre a emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila *a* na fase que antecede a migração de eletrões para o centro de reação do fotossistema II (Lidon *et al.*, 1993). Por oposição, na fase C de cada tratamento, subsistem valores de fluorescência significativamente mais baixos (Figura 3.35; Tabela 3.30), situação que também nestes parâmetros reforça a evolução de aspetos de clorose associados ao decorrer do ciclo de vida da planta.



**Figura 3.35** -  $F_0$  dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão ( $n = 4$ ) para cada concentração e dia de ensaio.

**Tabela 3.30** – Média da  $F_0$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da  $F_0$  para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. A letra *a* indica ausência de diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

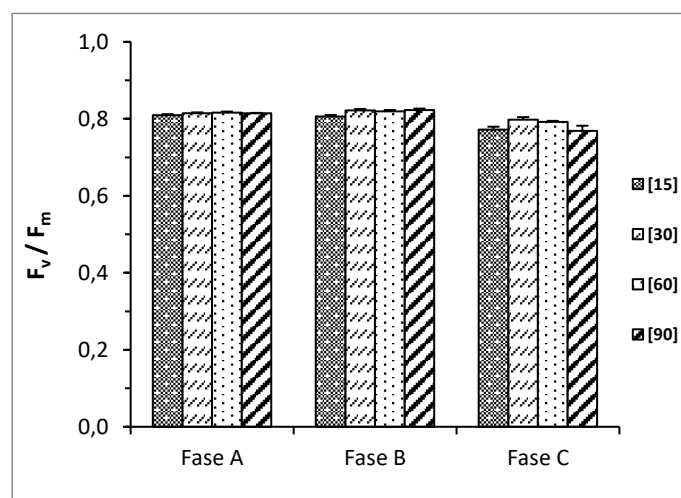
Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
Fase A	0,194 ± 0,002 (a, r)	0,177 ± 0,013 (a, r)	0,194 ± 0,004 (a, r)	0,200 ± 0,004 (a, r)
Fase B	0,197 ± 0,006 (a, r)	0,179 ± 0,004 (a, s)	0,187 ± 0,003 (a, r)	0,184 ± 0,004 (a, r, s)
Fase C	0,136 ± 0,006 (a, s)	0,157 ± 0,011 (a, s)	0,169 ± 0,008 (a, s)	0,179 ± 0,006 (a, s)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

A fluorescência variável e a eficiência fotoquímica máxima do PS II ( $F_v/F_m$ ) poderão traduzir uma medida quantitativa da eficiência fotoquímica do complexo PS II e do rendimento fotónico da evolução do oxigénio (Genty *et al.*, 1989) sob diferentes *stresses* ambientais (Al-Khatib e Paulsen, 1989). O tratamento de elevadas temperaturas nas folhas de trigo resultou num decréscimo do quociente  $F_v/F_m$  (Mishra e Singhal, 1992). Os autores atribuíram esta redução principalmente a uma diminuição da fluorescência variável, que resultou de um decréscimo da  $F_m$ , e num aumento gradual de  $F_0$ . Esses autores referem que, a nível fisiológico, os decréscimos observados no quociente  $F_v/F_m$  e em  $F_v$  indicam uma redução na eficiência fotoquímica do complexo PS II, a qual pode ser devida a uma transferência ineficiente de energia do LHC para os centros de reação. No nosso estudo  $F_v/F_m$ , nas fases A e B, não variou significativamente entre os diferentes tratamentos (Figura 3.36; Tabela 3.31), aspeto que aponta para a ausência de inibições, induzidas pelas cargas nutricionais aplicadas, sobre a

eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II. Por oposição, na fase C, os valores obtidos foram significativamente mais elevados nos tratamentos 30 mL e 60 mL (Figura 3.36; Tabela 3.31), aspeto que indicia uma possível interação entre aspetos evolutivos de clorose dos tecidos fotossintéticos decorrentes da evolução natural do ciclo da planta e a acumulação de nutrientes nesses tratamentos. Esta hipótese parece ainda reforçar-se na ocorrência de variações significativas, em cada tratamento, na fase C (Figura 3.36; Tabela 3.31).

$F_v/F_m$  reflete a eficiência fotoquímica máxima de captação de energia do fotossistema II. Um decréscimo neste parâmetro indica a existência de foto inibição. Segundo Zlatev e Lidon (2012), os níveis de  $F_v/F_m$  em diferentes matrizes vegetais oscilam entre 0,702 - 0,812, encontrando-se em conformidade com os resultados obtidos neste estudo. Adicionalmente, Dias *et al.* (2009, 2010) evidenciaram um decréscimo deste parâmetro, reflexo de um aumento da dissipação de energia sob a forma de calor, mediada por mecanismos fotoprotetores. Estes autores consideraram que  $F_v/F_m$  se situava entre 0,835 e 0,839. Neste enquadramento verificou-se que os resultados obtidos neste estudo (Figura 3.36; Tabela 3.31) são similares com os valores descritos por estes autores. Também Lidon *et al.* (1993) indicaram teores de  $F_v/F_m$  compreendidos entre 0,60 e 0,87 nas amostras em estudo.



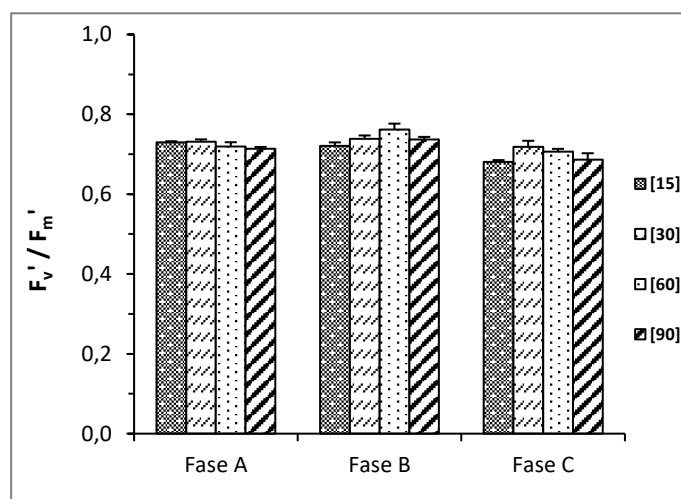
**Figura 3.36** –  $F_v/F_m$  dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.

**Tabela 3.31** – Média da  $F_v/F_m$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05\%$ ) da  $F_v/F_m$  para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	0,809 ± 0,003 (a, r)	0,814 ± 0,002 (a, r)	0,816 ± 0,002 (a, r)	0,814 ± 0,001 (a, r)
<b>Fase B</b>	0,806 ± 0,004 (a, r)	0,822 ± 0,004 (a, r)	0,819 ± 0,004 (a, r)	0,823 ± 0,004 (a, r)
<b>Fase C</b>	0,772 ± 0,007 (b, s)	0,798 ± 0,007 (a, s)	0,792 ± 0,002 (a, s)	0,769 ± 0,013 (b, s)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

$F_v/F_m'$ , nas fases A e C não variou significativamente entre os diferentes tratamentos, porém na fase B obtiveram-se valores significativamente menores nos tratamentos controlo e 90 mL (Figura 3.37; Tabela 3.32). Alterações significativas foram apenas detetadas na fase C do tratamento 15 mL. Estes dados apontam, nas fases A e C, para a ausência de inibições, induzidas pelas cargas nutricionais aplicadas, sobre a eficiência na conversão energética no PS II. Por oposição, os tratamentos 30 mL e 60 mL parecem sugerir para a gama de concentrações nutricionais aplicadas, uma alteração significativa nessa eficiência. De acordo com Lidon *et al.* (2015) os níveis de  $F_v/F_m'$  em sementes de trigo mole oscilam entre 0,559 - 0,580, valores ligeiramente inferiores face aos resultados obtidos no nosso estudo (Figura 3.37; Tabela 3.32).



**Figura 3.37** -  $F_v/F_m'$  dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.

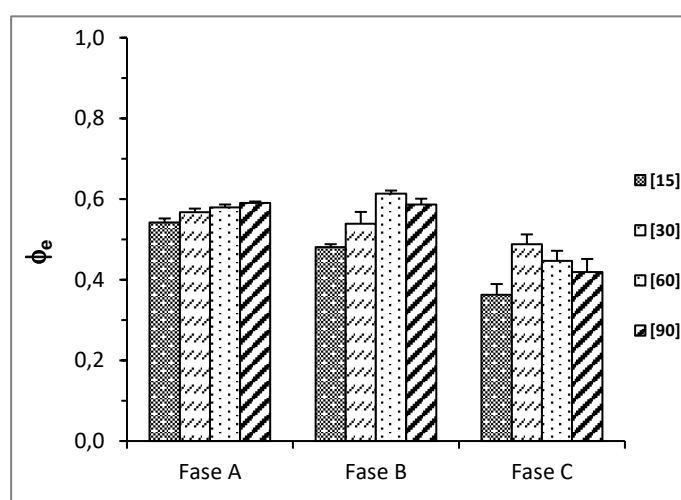
**Tabela 3.32** – Média da  $F_v/F_m'$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da  $F_v/F_m'$  para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	0,730 ± 0,003 (a, r)	0,732 ± 0,006 (a, r)	0,719 ± 0,011 (a, s)	0,714 ± 0,004 (a, r, s)
<b>Fase B</b>	0,721 ± 0,009 (b, r)	0,739 ± 0,008 (a, b, r)	0,762 ± 0,015 (a, r)	0,737 ± 0,007 (a, b, r)
<b>Fase C</b>	0,681 ± 0,005 (a, s)	0,719 ± 0,015 (a, r)	0,706 ± 0,007 (a, s)	0,687 ± 0,016 (a, s)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

O parâmetro da Genty,  $\phi_e$ , indica a proporção de energia absorvida pelas clorofilas associadas ao PS II, podendo traduzir a taxa de transporte acíclico de eletrões (assim como uma indicação da fotossíntese total). Entre as fases A e C de cada tratamento,  $\phi_e$  decresceu de forma significativa (Figura 3.38; Tabela 3.33), sugerindo novamente estes dados que aspetos

de clorose e / ou necrose dos tecidos do mesófilo associados à evolução natural do ciclo de vida das plantas estarão limitando as reações fotoquímicas da fotossíntese. Adicionalmente, nas fases B e C, os diferentes tratamentos apresentam valores significativamente mais baixos no tratamento controlo (Figura 3.38; Tabela 3.33). Estes valores, que se correlacionam diretamente com os dados obtidos para as taxas fotossintéticas líquidas (Figura 3.31; Tabela 3.26), evidenciam de forma objetiva que a fração de luz absorvida e que é utilizada pelo fotossistema II aumenta de forma sinérgica, com a carga nutricional aplicada na solução nutritiva. De acordo com Lidon *et al.* (2015) os níveis de  $\phi_e$  em plantas de trigo mole oscilam entre 0,456 - 0,513, sendo estes valores semelhantes aos resultados obtidos no nosso estudo (Figura 3.38; Tabela 3.33).



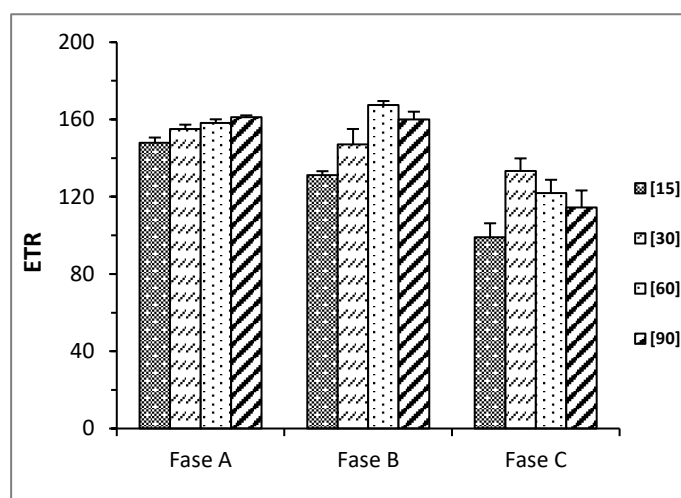
**Figura 3.38** -  $\phi_e$  dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.

**Tabela 3.33** – Média da  $\phi_e$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da  $\phi_e$  para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	0,542 ± 0,010 (a, r)	0,568 ± 0,009 (a, r)	0,580 ± 0,007 (a, r)	0,590 ± 0,004 (a, r)
<b>Fase B</b>	0,481 ± 0,007 (b, r)	0,539 ± 0,029 (b, r, s)	0,614 ± 0,007 (a, r)	0,586 ± 0,014 (a, r)
<b>Fase C</b>	0,363 ± 0,027 (b, s)	0,488 ± 0,024 (a, s)	0,447 ± 0,025 (a, s)	0,419 ± 0,032 (a, s)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

Neste enquadramento, entre as fases A e C de cada tratamento, *Electron Transport Rate* (ETR) revelou uma tendência similar a  $\phi_e$ , tendo decrescido de forma significativa (Figura 3.39; Tabela 3.34), aspeto que também reforça a emergência de aspetos de clorose e / ou necrose dos tecidos do parênquima clorofilino associados à evolução natural do ciclo de vida das plantas. Adicionalmente, para cada fase, os diferentes tratamentos também apresentam valores significativamente mais baixos no tratamento controlo (Figura 3.39; Tabela 3.34). Estes valores, que se correlacionam igualmente com os dados obtidos para  $\phi_e$  (Figura 3.38; Tabela 3.33), sugerem uma distorção mínima na eficiência da taxa de transporte de eletrões acoplada à fração de radiação fotossintética ativa absorvida e utilizada pelo fotossistema II.



**Figura 3.39** - ETR dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.

**Tabela 3.34** – Média da ETR, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da ETR para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

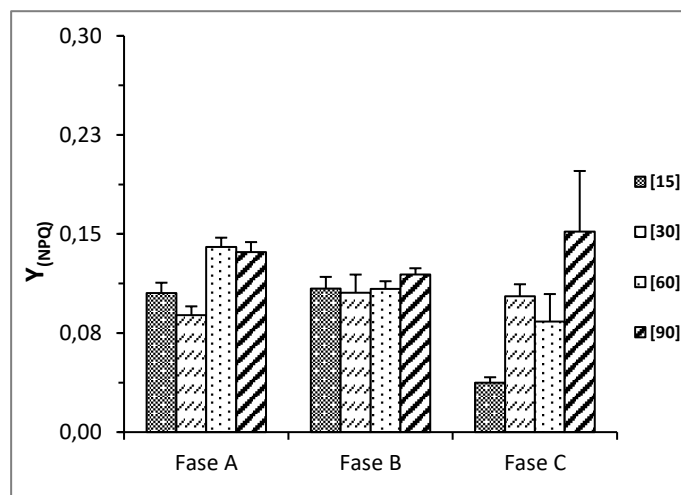
Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	148,0 ± 2,7 (a, r)	155,0 ± 2,3 (a, r)	158,2 ± 1,9 (a, r)	161,2 ± 1,0 (a, r)
<b>Fase B</b>	131,3 ± 2,0 (c, r)	147,2 ± 7,9 (b, c, r, s)	167,6 ± 2,0 (a, r)	160,1 ± 4,0 (a, b, r)
<b>Fase C</b>	99,0 ± 7,3 (b, s)	133,3 ± 6,6 (a, s)	121,9 ± 6,9 (a, s)	114,5 ± 8,8 (a, b, s)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

Relativamente a  $Y_{(NPQ)}$ , entre os diferentes tratamentos não se verificaram diferenças significativas nas fases A e B, porém na fase C os valores obtidos variaram de forma significativa, sendo os valores das plantas controlo os mais reduzidos (Figura 3.40; Tabela



3.35). Paralelamente, nos tratamentos 15 mL e 60 mL, os valores mais reduzidos foram obtidos na fase C. Verifica-se assim que o rendimento quântico do fotossistema II não apresenta variações apreciáveis face ao acréscimo da carga nutricional na solução nutritiva, contudo os resultados da fase C sugerem, também neste caso, uma interação complexa com a evolução do ciclo das plantas.



**Figura 3.40** -  $Y_{(NPQ)}$  dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão ( $n = 4$ ) para cada concentração e dia de ensaio.

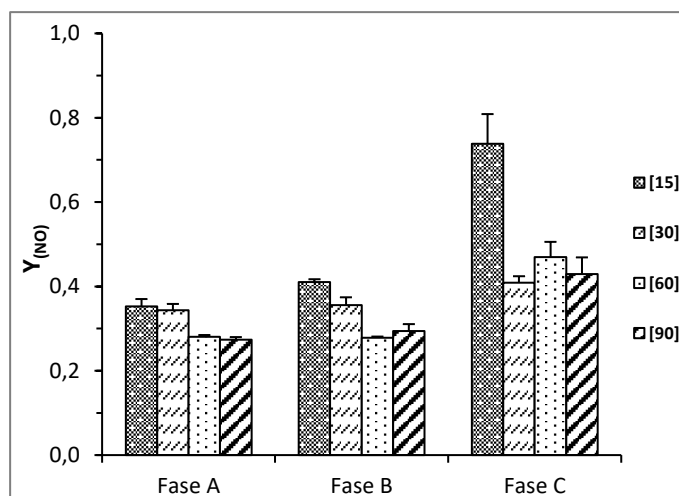
**Tabela 3.35** – Média da  $Y_{(NPQ)}$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da  $Y_{(NPQ)}$  para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	0,105 ± 0,008 (a, r)	0,089 ± 0,007 (a, r)	0,140 ± 0,007 (a, r)	0,136 ± 0,008 (a, r)
<b>Fase B</b>	0,109 ± 0,009 (a, r)	0,105 ± 0,014 (a, r)	0,108 ± 0,006 (a, r, s)	0,119 ± 0,005 (a, r)
<b>Fase C</b>	0,037 ± 0,004 (c, s)	0,103 ± 0,009 (a, b, r)	0,084 ± 0,021 (b, c, s)	0,152 ± 0,046 (a, r)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

O rendimento quântico associado à dissipação de energia sob a forma de calor e fluorescência ( $Y_{(NO)}$ ) não variou de forma significativa entre os tratamentos, no decurso da fase A, porém nas restantes fases o rendimento quântico foi significativamente mais elevado nas plantas controlo (Figura 3.41; Tabela 3.36). De igual modo, considerando cada tratamento isoladamente, verificou-se ainda que os valores mais elevados prevaleceram na fase C. Verifica-se assim uma correlação positiva entre o acréscimo de nutrientes na solução nutritiva

das plantas e a minimização de perdas energéticas sob a forma de fluorescência e / ou relaxação térmica.



**Figura 3.41** -  $Y_{(NO)}$  dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão ( $n = 4$ ) para cada concentração e dia de ensaio.

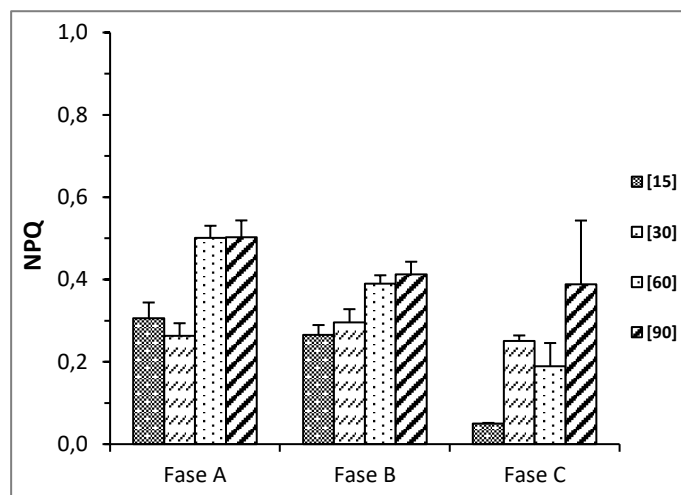
**Tabela 3.36** – Média da  $Y_{(NO)}$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da  $Y_{(NO)}$  para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	0,353 ± 0,017 (a, s)	0,344 ± 0,015 (a, r)	0,280 ± 0,004 (a, s)	0,273 ± 0,007 (a, s)
<b>Fase B</b>	0,411 ± 0,006 (a, s)	0,355 ± 0,019 (a, b, r)	0,278 ± 0,003 (b, s)	0,294 ± 0,016 (a, b, s)
<b>Fase C</b>	0,738 ± 0,071 (a, r)	0,409 ± 0,015 (b, r)	0,470 ± 0,036 (b, r)	0,429 ± 0,040 (b, r)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

O NPQ é um fator de amortecimento não-fotoquímico da fluorescência da clorofila. Este parâmetro constitui uma medida da dissipação não-radiativa da energia de excitação absorvida, protegendo o PS II, face à sobre-excitação (Demmig-Adams, 1990). Considerando este *quenching* não fotoquímico relativo ao estado excitado da clorofila *a*, verificou-se que não subsistiu uma tendência clara quando se consideram as variações significativas entre as diferentes fases ou entre os diferentes tratamentos (Figura 3.42; Tabela 3.37). Dias *et al.* (2009, 2010) constataram uma inibição significativa de NPQ, sugerindo um decréscimo da taxa de dissipação de energia, minimizando a proteção do aparelho fotossintético e permitindo uma sobre-excitação dos centros de reação do PS II. O decréscimo significativo de NPQ indicou para esse caso que o ATP sintetizado nas reações fotoquímicas estava a ser utilizado no ciclo

de Calvin. Estes autores consideraram que NPQ se situava entre 1,117 e 1,457. Neste enquadramento verificou-se que os resultados obtidos no nosso estudo (Figura 3.42; Tabela 3.37) se encontravam numa faixa inferior relativamente aos valores descritos por estes autores.



**Figura 3.42** – NPQ dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.

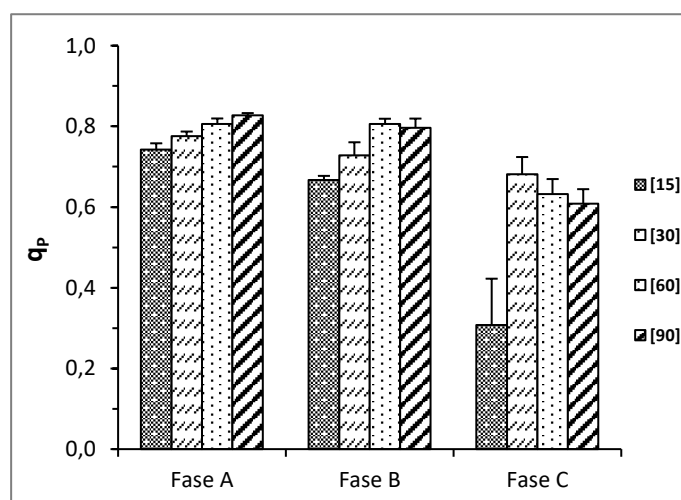
**Tabela 3.37** – Média da NPQ, respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da NPQ para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	0,306 ± 0,039 (a, b, r)	0,263 ± 0,031 (b, r)	0,501 ± 0,029 (a, r)	0,502 ± 0,041 (a, r)
<b>Fase B</b>	0,266 ± 0,024 (a, r)	0,296 ± 0,032 (a, r)	0,390 ± 0,020 (a, r)	0,412 ± 0,031 (a, r)
<b>Fase C</b>	0,050 ± 0,001 (b, s)	0,251 ± 0,014 (a, b, r)	0,189 ± 0,057 (a, b, s)	0,388 ± 0,155 (a, r)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

O fator de amortecimento fotoquímico da fluorescência da clorofila ( $q_p$ ) indica a proporção de energia de excitação capturada pelo PS II que é convertida em energia química nos centros de reação, estando relacionado com o estado redox da quinona A. Assim, maiores valores de  $q_p$  traduzem uma maior proporção de  $Q_A$  oxidado em relação ao reduzido, dando uma indicação da proporção de centros de reação do PS II que estão abertos e fechados (Yordanov *et al.*, 1999). Relativamente aos parâmetros  $q_p$  e  $q_L$ , entre os tratamentos da fase A e B não ocorreram variações significativas, surgindo idêntica tendência entre as diferentes fases de cada tratamento, com exceção do tratamento controlo (Figura 3.43-44; Tabela 3.38-39). Decréscimos em  $q_p$  são atribuíveis a reduções na taxa de consumo de redutores e ao ATP

produzido a partir do transporte acíclico de eletrões. Segundo Zlatev e Lidon (2012) os níveis de  $q_p$  em diferentes matrizes vegetais oscilam entre 0,356 - 0,816, encontrando-se em conformidade com os resultados obtidos no nosso estudo. Dias *et al.* (2009, 2010) reportaram que alterações não significativas de  $q_p$  em genótipos de trigo duro sugerem uma taxa de redução estabilizada dos centros de reação do PS II, indicando ainda a utilização eficaz da energia química no ciclo de Calvin. Estes autores constataram ainda que  $q_p$  se situava entre 0,717 - 0,774, resultados similares aos obtidos no nosso estudo (Figura 3.43-44; Tabela 3.38-39).



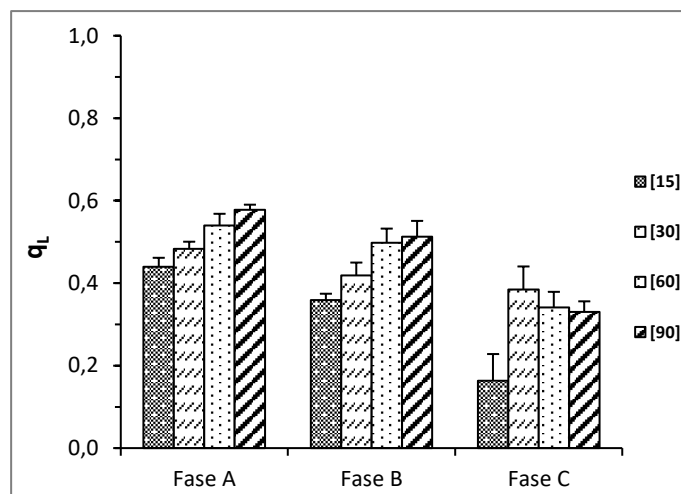
**Figura 3.43** -  $q_p$  dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão (n = 4) para cada concentração e dia de ensaio.

**Tabela 3.38** – Média da  $q_p$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da  $q_p$  para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	0,743 ± 0,015 (a, r)	0,776 ± 0,011 (a, r)	0,806 ± 0,013 (a, r)	0,827 ± 0,006 (a, r)
<b>Fase B</b>	0,667 ± 0,010 (a, r)	0,728 ± 0,032 (a, r)	0,806 ± 0,013 (a, r)	0,796 ± 0,023 (a, r)
<b>Fase C</b>	0,307 ± 0,115 (b, s)	0,681 ± 0,043 (a, r)	0,633 ± 0,037 (a, s)	0,609 ± 0,036 (a, s)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

Relativamente ao  $q_L$ , também pode assim afirmar-se que nas fases A e B, entre os diferentes tratamentos, independentemente da carga de nutrientes, não ocorreram variações apreciáveis na proporção de energia capturada e canalizada para os eventos fotoquímicos (acoplada ou não ao PS II).



**Figura 3.44** -  $q_L$  dos diferentes tratamentos, 23, 75, 104 dias após a germinação (Fase A, B, C, respetivamente), e respetivo erro padrão ( $n = 4$ ) para cada concentração e dia de ensaio.

**Tabela 3.39** – Média da  $q_L$ , respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) da  $q_L$  para as diferentes amostras nas variáveis concentração e fases do ensaio. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos em cada fase do ensaio. As letras *r*, *s* indicam diferenças significativas entre as várias fases, para cada tratamento.

Ensaio	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Fase A</b>	0,440 ± 0,022 (a, r)	0,483 ± 0,017 (a, r)	0,540 ± 0,028 (a, r)	0,578 ± 0,013 (a, r)
<b>Fase B</b>	0,359 ± 0,015 (a, r)	0,418 ± 0,031 (a, r)	0,498 ± 0,034 (a, r)	0,513 ± 0,038 (a, r)
<b>Fase C</b>	0,163 ± 0,065 (b, s)	0,385 ± 0,056 (a, r)	0,341 ± 0,038 (a, s)	0,330 ± 0,026 (a, s)

\* Dias após a germinação: Fase A= 23, Fase B= 75, Fase C= 104.

### 3.1.4 Composição do grão

#### 3.1.4.1. Localização de elementos minerais

Os grãos de cereais são um bom exemplo de sistemas altamente heterogêneos, proporcionando um desafio analítico para a imagiologia (Lombi *et al.*, 2011). A distribuição elementar nos grãos de cereais tem sido investigada com aplicação de diversas técnicas, particularmente em cevada (Lombi *et al.*, 2011a), trigo biofortificado (Ajiboye *et al.*, 2015) e arroz (Choi *et al.*, 2014). A partir dos mapeamentos elementares e considerando os mecanismos de processamento de alimentos é possível quantificar as perdas de nutrientes a partir dos grãos de cereais para o produto final, facto importante para a indústria de processamento de alimentos. Esta é uma ferramenta bastante importante, particularmente quando se analisam alimentos base biofortificados (Ajiboye *et al.*, 2015).

A biofortificação consiste numa técnica estabelecida não só para colmatar défices nutricionais de populações (Lidon *et al.*, 2015), mas também para estudar a elasticidade metabólica e os processos homeostáticos das plantas (Kabir *et al.*, 2014), assim como, as interações solo-planta e a fitorremediação (Wu *et al.*, 2015).

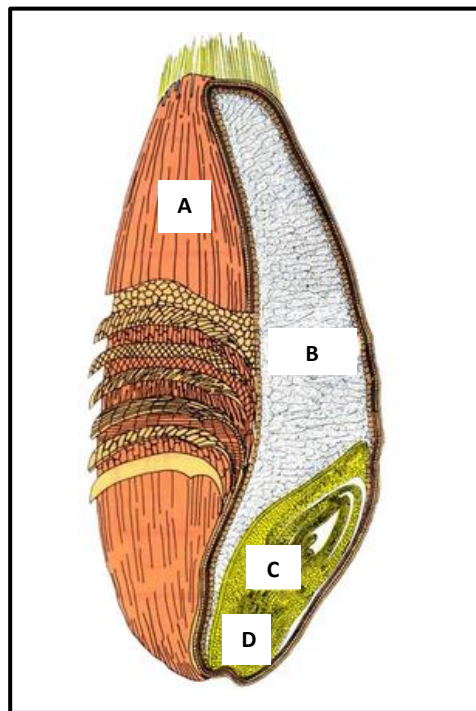
Os mapeamentos espectrais foram obtidos para todos os grãos e os resultados qualitativos são totalmente consistentes. Para o *Triticum durum*, variedade Marialva foram selecionados grãos dos tratamentos controlo (15 mL) e 90 mL. Na Figura 3.46 encontram-se os mapeamentos obtidos para os grãos selecionados.

Devido ao corte longitudinal dos grãos efetuado pelo sulco ventral é possível observar que a aleurona e a cavidade do endosperma permanecem numa metade do grão, enquanto a outra metade não apresenta estas estruturas. Saliente-se que a acumulação dos diferentes elementos minerais é específica para algumas estruturas do grão. Por exemplo, o Fe, Mn, Zn e Ca estão essencialmente concentrados no endosperma e na zona basal do embrião, enquanto que o K se encontra distribuído na aleurona. O P predomina essencialmente na camada interior da aleurona, em torno do endosperma, e no embrião (Figuras 3.45 e 3.46).

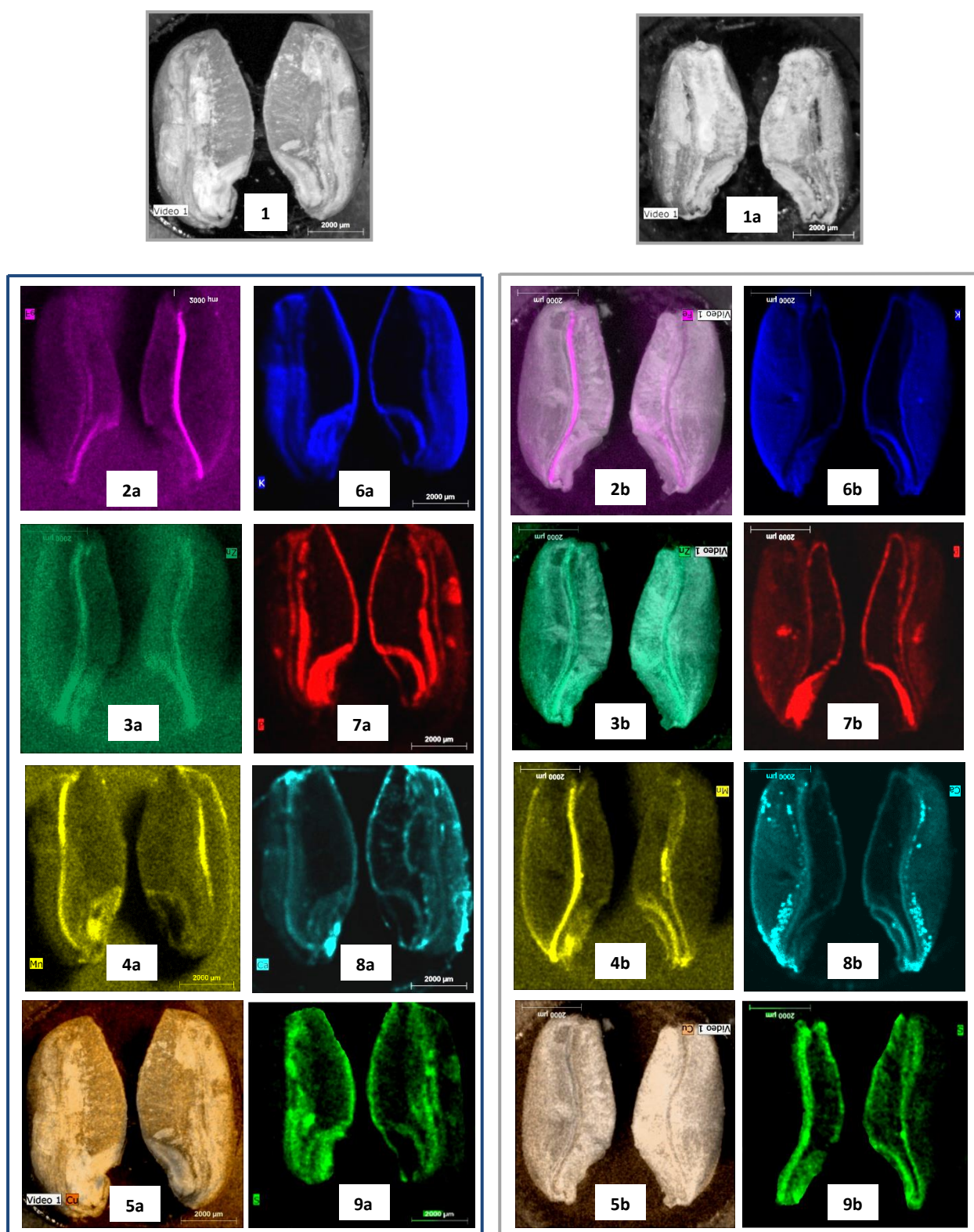
Em todos os grãos, com e sem biofortificação, é possível observar que o Ca também se encontra distribuído por todo o pericarpo, particularmente na hipoderme, o que está de acordo com Heneen e Brismar (1987) e Stomph *et al.* (2011). O Mn ocorre na zona basal do embrião porém em quantidades reduzidas. Estes resultados são um pouco díspares dos resultados propostos por Ajiboye *et al.* (2015), onde os grãos biofortificados apresentaram a maior concentração de Zn no embrião, decrescendo abruptamente no endosperma. O Cu constitui um caso interessante, pois embora seja observado em valores próximos do limite inferior de deteção da técnica, encontra-se presente em concentrações elevadas no endosperma e em qualquer uma das estruturas do farelo e da aleurona. Ajiboye *et al.* (2015) verificaram que o Cu estava presente essencialmente no endosperma e aleurona de grãos de trigo mole,

independentemente do processo de biofortificação. Note-se, contudo, que neste estudo se recorreu a uma adubação de fundo, contrastando com a adubação foliar de Ajiboye *et al.* (2015), o que pode explicar a elevada concentração de Cu na aleurona de grãos biofortificados.

Em síntese, neste estudo verificou-se que as maiores variações na concentração ocorrem no embrião. Adicionalmente, as concentrações dos micronutrientes são mais elevadas no farelo relativamente ao endosperma, o que indica que o conjunto de grãos de trigo deve inevitavelmente ser utilizado para obtenção de sêmola integral, necessária no fabrico de massas alimentícias biofortificadas para consumo humano. O facto de o embrião ser removido durante o processo de moagem significa que a estrutura com maior variação de micronutrientes também é removida, no entanto, mesmo uma pequena variação da fração de massa no endosperma pode conduzir a um incremento significativo na quantidade desses micronutrientes.



**Figura 3.45** – Caracterização do grão de trigo com representação dos seus componentes principais: farelo (A), endosperma (B), embrião (C) e zona basal do embrião (D) (Brouns *et al.*, 2013).

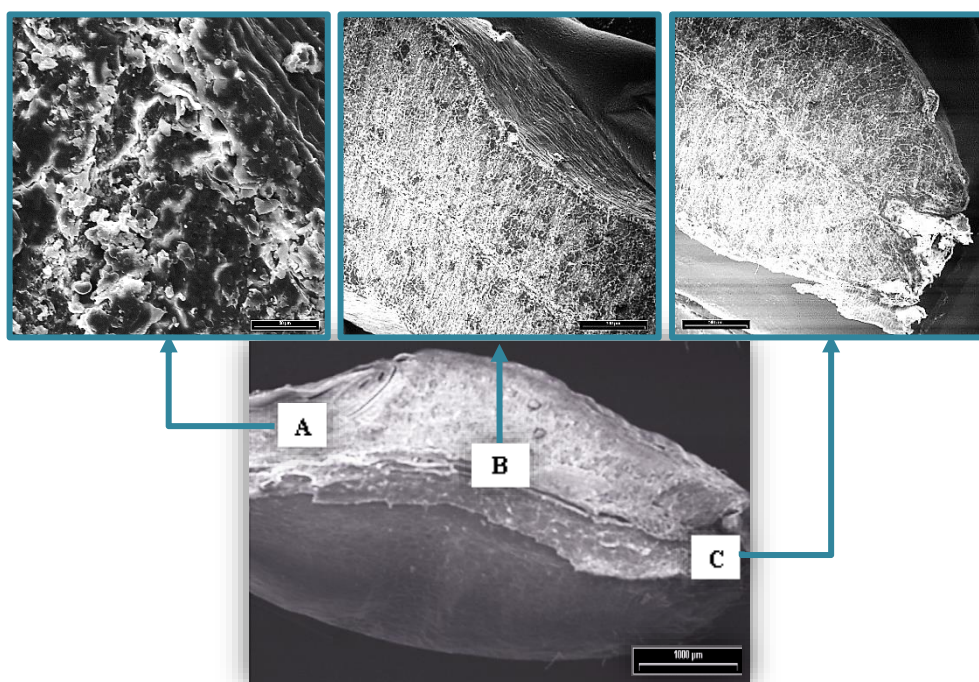


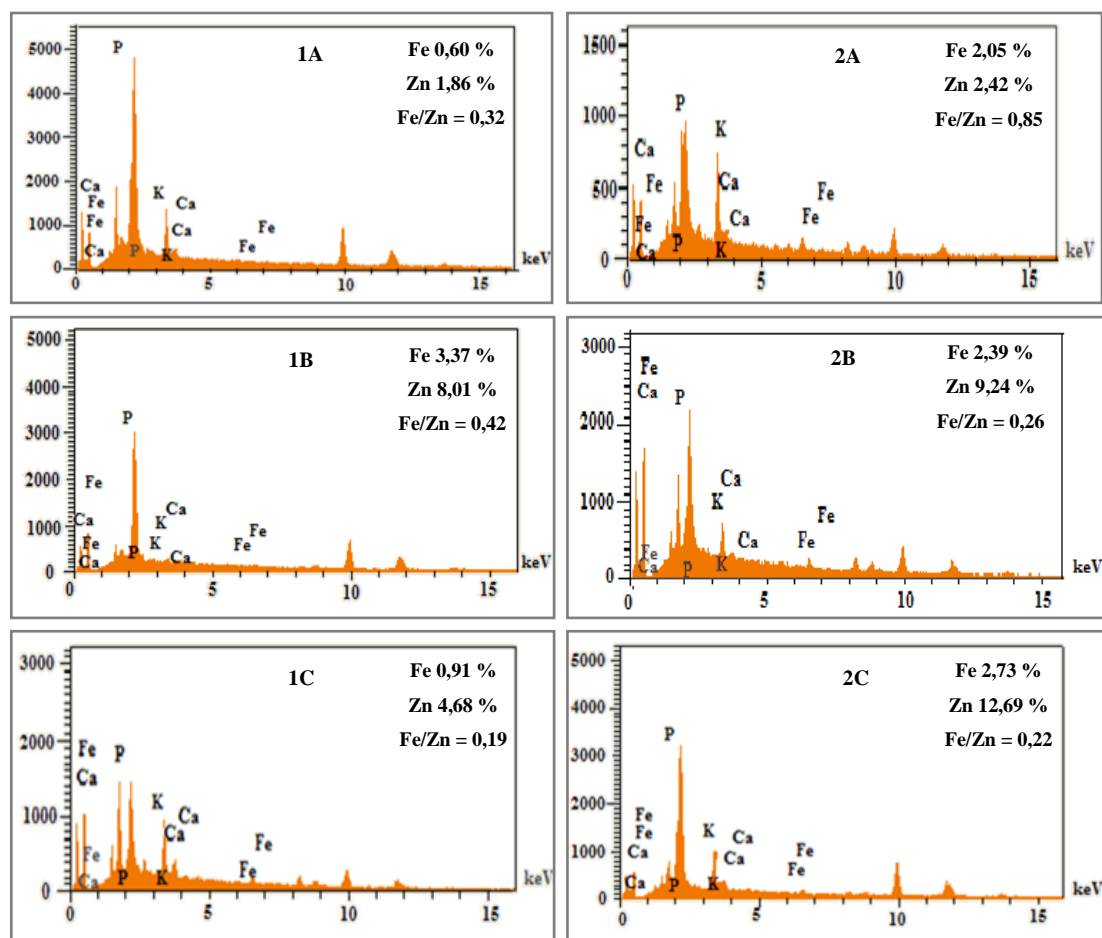
**Figura 3.46** – Imagens de uma semente de trigo duro selecionada longitudinalmente através de análise espectrométrica por fluorescência de raios X de distintos elementos minerais: Microscopia eletrônica de varrimento (1 e 1a); Fe (2); Zn (3); Mn (4); Cu (5); K (6); P (7); Ca (8) e S (9), referente aos tratamentos 15 mL (a) e 90 mL (b).



Após análise da semente com recurso a microscopia eletrónica de varrimento acoplada a uma sonda de raios X foi possível constatar que (Figura 3.47) valores mínimos de Fe e Zn se localizaram no embrião tanto no tratamento 15 mL como no tratamento 90 mL. Verificou-se ainda que no tratamento 15 mL, o Fe e o Zn se localizaram preferencialmente na região equatorial do endosperma da semente (Fe 3,37 %; Zn 8,01 %). Paralelamente constatou-se no tratamento 90 mL, uma localização específica destes elementos minerais na região apical terminal da semente (Fe 2,73 %; Zn 12,69 %). Por oposição, Cakmak *et al.* (2010b) consideraram para o tratamento controlo (Fe 0,0089 %; Zn 0,0038 %) e para o tratamento de adubação foliar (Fe 0,0089 %; Zn 0,0047 %) que o Fe e o Zn predominaram no embrião.

Uma análise comparativa entre os tratamentos permitiu ainda constatar que a razão Fe / Zn sofreu um incremento de 0,32 para 0,85 do tratamento 15 mL para o tratamento 90 mL no embrião. Esta mesma razão aumentou na região apical terminal da semente de 0,19 para 0,22, decrescendo na região equatorial do endosperma de 0,42 para 0,26. Observou-se que no tratamento 15 mL a razão Fe / Zn aumentou na região equatorial do endosperma e posteriormente decresceu na região apical terminal da semente. Relativamente ao tratamento de maior carga nutricional (90 mL), verificou-se uma tendência decrescente ao longo do grão (do embrião para a extremidade apical).





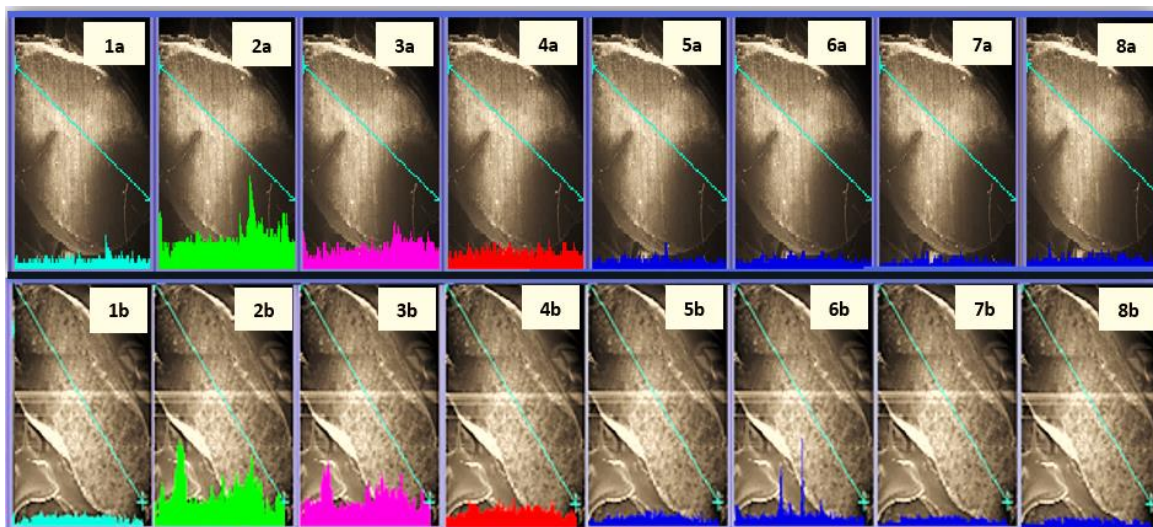
**Figura 3.47-** Microscopia eletrônica de varrimento acoplada a microanálise de raios X e localização de elementos minerais na semente, particularmente no embrião (A), região equatorial do endosperma (B) e região apical terminal (C) para os tratamentos 15 mL (1) e 90 mL (2).

A fração mássica (W %) referente ao ferro e zinco corresponde à percentagem destes elementos face ao total de elementos considerados, nomeadamente Na, Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu e Zn, sendo o somatório de 100 %.

Cakmak *et al.* (2010b) sugeriram que entre as diferentes frações do grão, o endosperma obteve a menor concentração de Zn. Particularmente para o tratamento controlo (sem aplicação foliar de Zn) o embrião apresentava concentrações de Zn similares comparativamente com a região apical terminal. A aplicação de tratamentos foliares de Zn incrementou significativamente as concentrações deste elemento mineral nas três frações do grão. Cakmak *et al.* (2010b) constataram que o Zn se encontra preferencialmente na aleurona e embrião. Aplicações de Zn no solo resultaram num decréscimo da concentração de Fe em todas as frações do grão, principalmente na aleurona e embrião. De forma a obter um impacto biológico mensurável na saúde humana, a concentração de Zn no grão deve ser incrementada para 10 mg kg<sup>-1</sup>. Estes autores obtiveram incrementos de 17 mg kg<sup>-1</sup>. Resultados semelhantes foram relatados por Kutman *et al.* (2010) num estudo efetuado em estufa com trigo duro. Ozturk *et al.* (2006) também constataram que a adubação foliar incrementou significativamente as

concentrações de Zn no grão de trigo, apontando para uma elevada mobilidade deste elemento mineral nas plantas. Estes autores observaram ainda que o Zn se encontra localizado preferencialmente no embrião e na aleurona. Adicionalmente, Ehret (1985) demonstrou que o Zn está particularmente concentrado no embrião, sendo que na totalidade do grão de trigo a sua concentração foi de 27 mg kg<sup>-1</sup>. Neste enquadramento verificou-se que os resultados obtidos no nosso estudo divergem de forma substancial dos resultados propostos por estes autores. Observou-se uma localização preferencial de Fe e Zn na região equatorial do endosperma da semente (Figura 3.47) neste estudo. Contrariamente, de acordo com a literatura, estes elementos minerais encontraram-se preferencialmente na aleurona e embrião.

A análise espectrométrica por fluorescência de raios X (Figura 3.46) é uma técnica semi-quantitativa, com uma reduzida incidência do feixe. Analogamente, a microscopia eletrónica de varrimento acoplada a microanálise de raios X (Figura 3.48) consiste numa técnica quantitativa, com um índice de quantificação mais sensível e um maior poder de deteção. De facto, confirma-se que a proporção de elementos minerais existentes no interior do endosperma é substancialmente reduzida, não sendo comparável com a proporção existente na sêmea. As concentrações dos elementos Mn, Fe, Cu e Zn são uniformes e residuais, não sendo possível distinguir entre o tratamento controlo (15 mL) e o tratamento biofortificado (90 mL), devido à localização preferencial destes elementos minerais na sêmea do grão de trigo.



**Figura 3.48** – Registo espectral da deposição de Mg (1), P (2), K (3), Ca (4), Mn (5), Fe (6), Cu (7) e Zn (8) respetivamente, referente aos tratamentos 15 mL (a) e 90 mL (b), segundo o corte longitudinal da semente, conforme indicado pelo traçado azul.

### 3.1.4.2 Fração lipídica total e composição em ácidos gordos

Nos grãos dos cereais, os lípidos encontram-se maioritariamente como triacilgliceróis ou lípidos de reserva, sendo os ácidos gordos uma importante fração dos mesmos. Adicionalmente, os ácidos gordos estão também presentes em diversas estruturas celulares, sob a forma de lípidos membranares (Becker, 2007). Os lípidos não se encontram distribuídos de forma homogênea no grão, sendo que cerca de 30 % destes estão presentes no gérmen, 25 % na aleurona e 45 % no endosperma (Becker, 2007). Na sêmola de trigo duro os lípidos livres representam 64 % do total de lípidos (Sissons, 2008).

Os lípidos naturais da sêmola de trigo são considerados de importância vital no comportamento do glúten, apesar de estarem presentes em concentrações entre 1 e 3 % de matéria seca (Sissons, 2008). Tendo em conta os lípidos presentes na sêmola de trigo, os lípidos amídicos existem como um complexo amilose-lipídico dentro do grânulo de amido, sendo dificilmente extraídos. Paralelamente, os lípidos não amídicos participam nas reações físicas, químicas e bioquímicas da massa, contribuindo significativamente para o seu comportamento na panificação (Chung, 1986).

Outros lípidos presentes no trigo duro incluem hidrocarbonetos, esteróis, glicerídeos, ácidos gordos, glicolípidos e fosfolípidos. Os hidrocarbonetos estão presentes em quantidades reduzidas (0,0036 % <sub>peso seco</sub>). Os esteróis livres apresentam teores no trigo duro entre 25 - 38 mg 100g<sup>-1</sup> de trigo, consistindo sobretudo em sitosterol e campesterol (Sissons, 2008).

Os lípidos encontram-se envolvidos no desenvolvimento de características de aroma, sabor e textura. Estes podem sofrer degradações, tais como oxidação, hidrólise ou polimerização durante o processamento, favorecendo ou prejudicando as características sensoriais do produto alimentar (Sgarbieri, 1987).

O processo de oxidação ocorre por mecanismo enzimático, através da lipoxigenase, podendo causar modificações na cor da sêmola, textura, sabor, odor e alterações nutricionais, como degradação de vitaminas, aminoácidos e ácidos gordos essenciais (Farrington *et al.*, 1981).

Os lípidos são fundamentais na determinação da cor da massa devido aos pigmentos e à lipoxigenase. Os pigmentos encontrados no endosperma consistem maioritariamente em xantofilas, sendo a luteína a principal xantofila no trigo duro. É desejável uma cor amarela brilhante nas massas alimentícias, que surge a partir dos pigmentos no endosperma, sendo possível ocorrer uma redução na cor durante o seu processamento. Este aspeto deve-se à oxidação de pigmentos amarelos catalisada pela enzima lipoxigenase presente na sêmola, principalmente durante a hidratação e mistura (Sissons, 2008).

Durante o processo de mistura da massa, os lípidos livres interagem com outros componentes da sêmola, particularmente proteínas de forma a fornecer uma influência

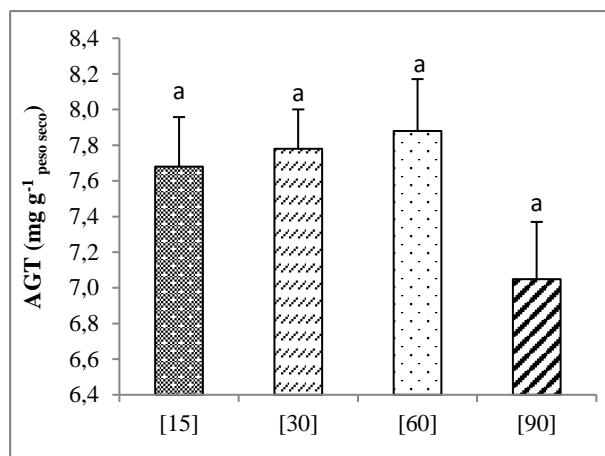
benéfica na força do glúten. Os lípidos polares interagem principalmente com gluteninas, podendo ligar-se a gliadinas através de ligações hidrofílicas. No trigo, a interação dos lípidos polares livres com proteínas apresenta efeitos benéficos na qualidade. Estas interações melhoram a estabilidade da estrutura da massa e, consequentemente, o volume do pão (Sissons, 2008). Matsuo *et al.* (1986) observaram que a remoção de lípidos totais e lípidos não-polares apresentou efeitos prejudiciais na qualidade da massa, tais como um aumento da viscosidade e perda de cozedura.

Os lípidos presentes no grão de trigo contêm ácidos gordos essenciais para a saúde humana, destacando-se os ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) (El-Dash *et al.*, 1982; Sgarbieri, 1987). Os ácidos linoleico e linolénico são ácidos gordos essenciais, pois exercem funções energéticas, estruturais e hormonais. A importância dos mesmos deve-se ao facto destes manterem a fluidez das membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos (Youdim *et al.*, 2000).

A nível tecnológico, durante a mistura da massa ocorrem paralelamente dois processos em que os lípidos intervêm: atuam como lubrificantes, permitindo o deslizamento das camadas do glúten durante a homogeneização da massa e o segundo aspeto prende-se com os ácidos gordos polinsaturados, que são oxidados pela lipoxigenase do trigo, produzindo hidroperóxidos e radicais livres, que por sua vez podem oxidar outros constituintes, tais como proteínas e carotenoides (Hoseney, 1994).

Apesar de presentes em quantidades reduzidas no grão de trigo, os lípidos são responsáveis pelo processo de rancificação nestes produtos. Quanto maior a quantidade de lípidos na sêmola, mais rápida a sua deterioração, sendo maior a suscetibilidade da sêmola integral aos processos de lipoperoxidação. A ocorrência de rancificação é minorada pela ação de antioxidantes naturais, destacando-se os tocoferóis, presentes na sêmola de trigo (Hoseney, 1994).

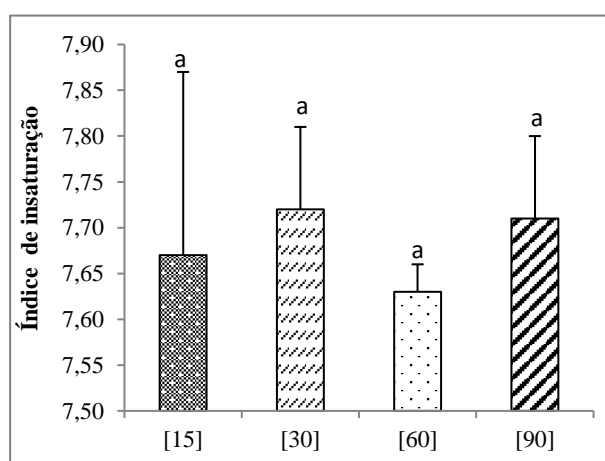
No grão não se verificaram variações significativas entre os diferentes tratamentos, tendo os teores de ácidos gordos totais (AGT) oscilado entre 7,05 - 7,88 mg g<sup>-1</sup> peso seco (Figura 3.49). Tendo em conta os tratamentos em estudo, observou-se que os tratamentos 30 mL e 60 mL apresentaram teores mais elevados face aos restantes, o que reflete uma maior quantidade de lípidos no grão.



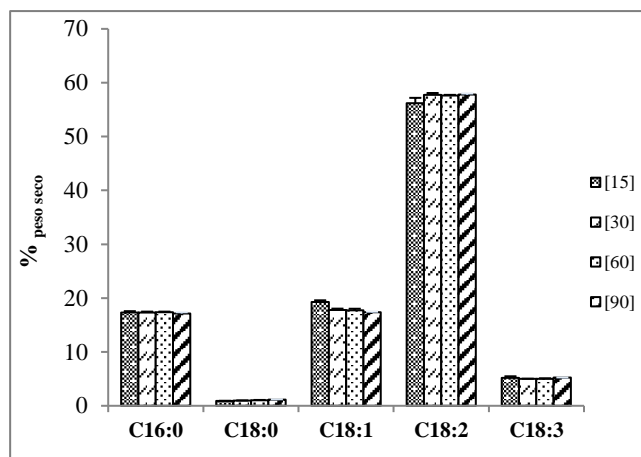
**Figura 3.49** – Ácidos gordos totais (AGT) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. A letra *a* indica a ausência de diferenças significativas entre as concentrações estudadas.

O índice de insaturação (*double bond index*, DBI) traduz o equilíbrio entre os ácidos gordos, diferenciando no seu grau de insaturação (Lidon *et al.*, 2015). No grão não se observaram variações significativas entre os diferentes tratamentos, tendo os teores oscilado entre 7,63 - 7,72 (Figura 3.50).

Atendendo aos requisitos de armazenamento, estabilidade e preservação das características da sêmola, torna-se desejável utilizar tratamentos com um menor índice de insaturação, ou seja, menor abundância de ácidos gordos insaturados. Esta característica poderá tornar a sêmola menos suscetível aos processos de lipoperoxidação, retardando a sua deterioração. Neste contexto poderão ser mais adequados os tratamentos 15 mL e 60 mL, pois apresentam teores mais reduzidos face aos restantes tratamentos.



**Figura 3.50** – Índice de insaturação (DBI) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. A letra *a* indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos estudados.  $DBI = [(\% \text{ monoenes} + 2 \times \% \text{ dienes} + 3 \times \% \text{ trienes}) / (\% \text{ ácidos gordos saturados})]$  (Mazliak, 1983).



**Figura 3.51** – Percentagem dos ácidos gordos mais abundantes (> 0,5 %) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

**Tabela 3.40** – Média da percentagem dos ácidos gordos mais abundantes (> 0,5 %), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %), para cada tratamento. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo.

Ácidos Gordos	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>C16:0</b>	17,29 ± 0,284 a	17,32 ± 0,169 a	17,36 ± 0,126 a	17,15 ± 0,218 a
<b>C18:0</b>	0,91 ± 0,006 c	0,97 ± 0,021 b,c	1,05 ± 0,038 a,b	1,17 ± 0,039 a
<b>C18:1</b>	19,25 ± 0,336 a	17,76 ± 0,280 b	17,74 ± 0,280 b	17,40 ± 0,072 b
<b>C18:2</b>	56,18 ± 1,003 a	57,73 ± 0,357 a	57,61 ± 0,133 a	57,82 ± 0,165 a
<b>C18:3</b>	5,22 ± 0,264 a	5,01 ± 0,020 a	5,03 ± 0,073 a	5,26 ± 0,005 a

Quanto à composição qualitativa dos ácidos gordos (Figura 3.51; Tabela 3.40), destacaram-se, pela sua abundância, os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3), com percentagens que oscilaram entre 0,91 - 57,82 %.

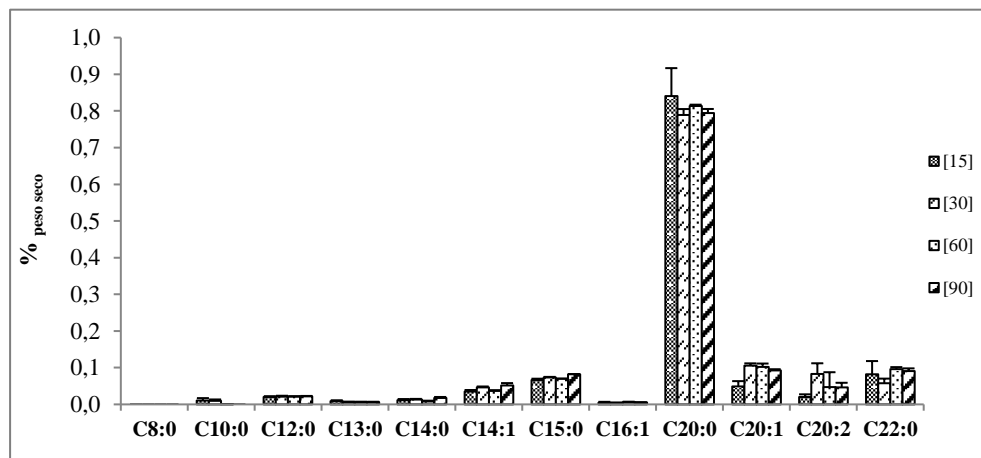
Os teores de ácido palmítico não revelaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Os valores percentuais de ácido esteárico aumentaram significativamente entre os tratamentos 15 mL e 90 mL, com um valor máximo de 1,17 % no tratamento 90 mL. Relativamente ao ácido oleico verificou-se que em todos os tratamentos não ocorreram variações significativas, à exceção do tratamento 15 mL. Quanto aos ácidos linoleico e linolénico não se observaram diferenças significativas entre os tratamentos, atingindo um valor máximo de 57,82 % e 5,26 %, respetivamente no tratamento 90 mL.



Relativamente aos ácidos gordos, em todos os tratamentos, C18:2 foi o mais abundante, seguindo-se C16:0, C18:1, C18:3 e C18:0, tal como referido por Lidon *et al.* (2015).

Prabhasankar *et al.* (2000) detetaram valores que oscilam entre 38,2 % - 58,5 % para o ácido linoleico (C18:2) em grãos de trigo. Dunford (2005) refere que os teores de ácidos gordos correspondem a cerca de 56 % para o ácido linoleico (C18:2), 16,4 % para o ácido palmítico (C16:0) e 14,0 % para o ácido oleico (C18:1). Neste enquadramento verificou-se que os valores obtidos neste estudo se integram na faixa apontada por estes autores.

De acordo com Tsuzuki *et al.* (2014) e Lidon *et al.* (2015) os teores médios de ácidos gordos correspondem a 15,6 % referente ao ácido palmítico (C16:0), 0,9 % para o ácido esteárico (C18:0), 14,0 % para o ácido oleico (C18:1), 62,6 % relativamente ao ácido linoleico (C18:2) e cerca de 5,1 % para o ácido linolénico (C18:3) em grãos inteiros de trigo. Confrontando os resultados obtidos (Figura 3.51; Tabela 3.40), estes encontram-se na faixa apontada por estes autores, com exceção dos ácidos palmítico e oleico que apresentam valores substancialmente superiores.



**Figura 3.52** – Percentagem dos ácidos gordos menos representativos (< 1 %) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.



**Tabela 3.41** – Média da percentagem dos ácidos gordos menos representativos (< 1 %), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) para cada tratamento. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo.

Ácidos Gordos	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>C8:0</b>	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
<b>C10:0</b>	0,01 ± 0,007 a	0,01 ± 0,004 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
<b>C12:0</b>	0,02 ± 0,002 a	0,02 ± 0,003 a	0,02 ± 0,001 a	0,02 ± 0,001 a
<b>C13:0</b>	0,01 ± 0,002 a	0,01 ± 0,001 a	0,01 ± 0,001 a	0,01 ± 0,001 a
<b>C14:0</b>	0,01 ± 0,003 a	0,01 ± 0,002 a	0,01 ± 0,002 a	0,02 ± 0,003 a
<b>C14:1</b>	0,04 ± 0,004 a	0,05 ± 0,003 a	0,04 ± 0,002 a	0,05 ± 0,006 a
<b>C15:0</b>	0,07 ± 0,004 a	0,07 ± 0,001 a	0,07 ± 0,000 a	0,08 ± 0,001 a
<b>C16:1</b>	0,00 ± 0,002 a	0,00 ± 0,000 a	0,01 ± 0,001 a	0,01 ± 0,001 a
<b>C20:0</b>	0,84 ± 0,077 a	0,79 ± 0,016 a	0,81 ± 0,004 a	0,79 ± 0,011 a
<b>C20:1</b>	0,05 ± 0,015 b	0,11 ± 0,006 a	0,10 ± 0,009 a	0,09 ± 0,004 a,b
<b>C20:2</b>	0,02 ± 0,007 a	0,08 ± 0,029 a	0,05 ± 0,040 a	0,05 ± 0,013 a
<b>C22:0</b>	0,08 ± 0,036 a	0,06 ± 0,013 a	0,10 ± 0,005 a	0,09 ± 0,008 a

Destacam-se como ácidos gordos menos representativos (< 1 %) no grão, (Figura 3.52; Tabela 3.41), os ácidos caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0), tridecanóico (C13:0), mirístico (C14:0), miristoléico (C14:1), pentadecanóico (C15:0), palmitoleico (C16:1), aráquico (C20:0), gadoleico (C20:1), eicosadienoico (C20:2) e behénico (C22:0), com percentagens que oscilaram entre 0,00 – 0,84 %, estando em conformidade com os dados referidos na literatura (Tsuzuki *et al.*, 2014).

Nenhum dos ácidos gordos apresentou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, à exceção do ácido gadoleico (C20:1), observando-se um valor máximo de 0,11 %, no tratamento 30 mL.

### 3.1.4.3 Glícidos

Os cereais armazenam energia sob a forma de amido, que representa cerca de 65 - 70 % da sêmola de trigo. Este acumula-se na forma de grânulos que se formam dentro de amiloplastos sendo essencialmente de dois tipos, grânulos do tipo A e do tipo B. Estes são constituídos por dois tipos de polissacáridos, amilose e amilopectina (Svihus *et al.*, 2005). A amilose é essencialmente uma molécula linear enquanto a amilopectina consiste num polímero bastante ramificado (Pallarés *et al.*, 2007). As propriedades funcionais do amido,

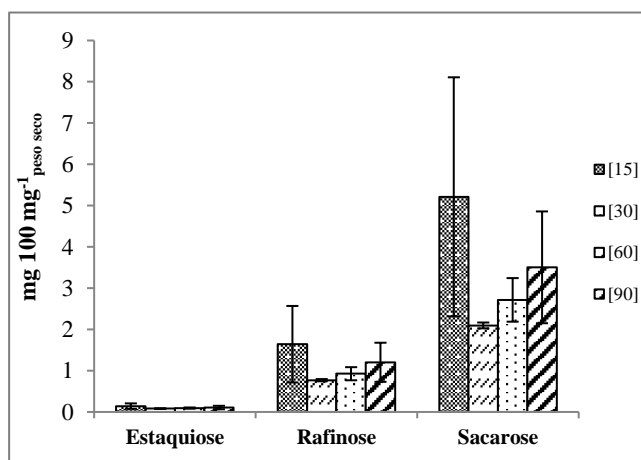
particularmente a sua capacidade para absorver água e formar uma massa são afetadas por variações nas proporções de amilose para amilopectina e pela distribuição e tamanho dos grânulos de amido (Dengate, 1984).

Adicionalmente o grão de trigo duro contém monossacáridos, dissacáridos e trissacáridos em quantidades reduzidas, usualmente expressas em percentagem de matéria seca, designadamente frutose, 0,06 %; glucose, 0,08 %; galactose, 0,02 %; sacarose, 0,54 %; maltose, 0,05 % e rafinose, 0,19 % (Hoseney, 1994; Matz, 1999). O endosperma do grão de trigo contém uma pequena proporção de outros polissacáridos, que se incluem no grupo das fibras, particularmente, arabinoxilanos, D-glucanos e celulose (Pallarés *et al.*, 2007).

A nível industrial, os glícidos envolvidos no processo de fermentação têm origem a partir de açúcares pré-existent nas sêmolas, tais como a sacarose e a glucose que estão presentes geralmente entre 1 - 2 %, e açúcares gerados pela degradação de frações de amido por amilases contidas na massa, produzindo maltose no decurso da fermentação (Pallarés *et al.*, 2007).

Do ponto de vista nutricional, o manitol parcialmente absorvido pelo organismo atua como antioxidante e como adoçante de baixo valor calórico (Wisselink *et al.*, 2002), estando descritos alguns efeitos colaterais associados à sua ingestão em doses excessivas (> 20g dia<sup>-1</sup>) (Schiweck *et al.*, 1994).

Encontram-se presentes outros açúcares solúveis nas amostras de trigo duro, particularmente a rafinose e a estaquiose. A distribuição destes açúcares varia de acordo com o grão (Pettersen e Makintosh, 1994). A rafinose consiste num trissacárido constituído por uma molécula de galactose, uma de glucose e outra de frutose. Por sua vez, a estaquiose consiste num tetrassacárido que contém duas moléculas de galactose, uma de glucose e outra de frutose. Estes fazem parte do grupo de açúcares dietéticos reconhecidos como oligossacáridos não digeríveis (Playne e Crittenden, 1996).

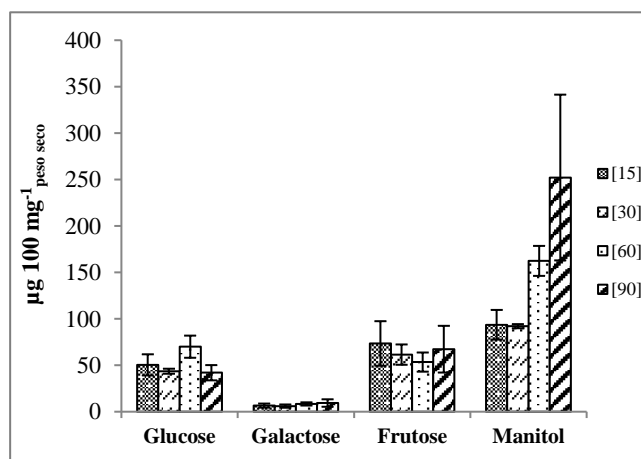


**Figura 3.53** – Teor médio de glícidos no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

**Tabela 3.42** – Média do teor de glúcidos no grão ( $\text{mg } 100 \text{ mg}^{-1}$  peso seco), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ), para cada tratamento. A letra *a* indica que não existem diferenças significativas entre os tratamentos para cada glícido.

Glúcidos	[15]	[30]	[60]	[90]
Estaquiose	$0,14 \pm 0,066$ a	$0,08 \pm 0,004$ a	$0,09 \pm 0,014$ a	$0,11 \pm 0,042$ a
Rafinose	$1,64 \pm 0,926$ a	$0,77 \pm 0,027$ a	$0,93 \pm 0,159$ a	$1,20 \pm 0,474$ a
Sacarose	$5,21 \pm 2,896$ a	$2,10 \pm 0,071$ a	$2,72 \pm 0,528$ a	$3,50 \pm 1,354$ a

Quanto à estaquiose, rafinose e sacarose não se observaram variações significativas entre os diferentes tratamentos, atingindo um valor máximo de 0,14, 1,64 e 5,21  $\text{mg } 100 \text{ mg}^{-1}$  peso seco, respetivamente no tratamento 15 mL (Figura 3.53; Tabela 3.42). Os resultados obtidos no nosso estudo são similares aos relatados por Hidalgo e Brandolini (2011) em amostras de sêmola de trigo duro.



**Figura 3.54** – Teor médio de glúcidos no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.

**Tabela 3.43** – Média do teor de glúcidos no grão ( $\mu\text{g } 100 \text{ mg}^{-1}$  peso seco), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) para cada tratamento. A letra *a* indica que não existem diferenças significativas entre os tratamentos para cada glícido.

Glúcidos	[15]	[30]	[60]	[90]
Glucose	$50,44 \pm 11,381$ a	$43,59 \pm 2,692$ a	$70,02 \pm 11,920$ a	$41,98 \pm 8,216$ a
Galactose	$6,59 \pm 2,182$ a	$6,04 \pm 1,742$ a	$8,37 \pm 1,716$ a	$9,35 \pm 4,024$ a
Fructose	$73,51 \pm 23,974$ a	$61,49 \pm 10,947$ a	$53,44 \pm 10,309$ a	$67,33 \pm 25,147$ a
Manitol	$93,64 \pm 15,972$ a	$92,11 \pm 2,216$ a	$162,39 \pm 16,145$ a	$252,18 \pm 89,237$ a

Relativamente aos teores de glucose, galactose, frutose e manitol, não variaram de forma significativa entre os diferentes tratamentos, atingindo um valor máximo de 70,02; 9,35; 73,51 e 252,18  $\mu\text{g } 100 \text{ mg}^{-1}$  peso seco, respetivamente (Figura 3.54; Tabela 3.43).

Hidalgo e Brandolini (2011) reportaram teores de glucose em amostras de sêmola de trigo duro compreendidos entre 20 - 40  $\mu\text{g } 100 \text{ mg}^{-1}$  peso seco, valores substancialmente inferiores aos obtidos no nosso estudo. Estes autores detetaram também teores de frutose compreendidos entre 40 - 70  $\mu\text{g } 100 \text{ mg}^{-1}$  peso seco, encontrando-se em conformidade com os resultados obtidos.

#### **3.1.4.4 Proteínas e fração azotada**

As proteínas do grão de trigo foram desde muito cedo objeto de investigação, sendo das primeiras proteínas a serem isoladas num estado relativamente puro (Beccari, 1728 citado por Wrigley *et al.*, 2006).

Osborne (1907) estabeleceu a base da nomenclatura das proteínas dos cereais de acordo com as suas solubilidades, particularmente albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em solução salina), gliadinas (solúveis em etanol a 70 %) e gluteninas (solúveis em solução ácida ou alcalina).

As albuminas e globulinas são proteínas citoplasmáticas com atividade enzimática, que estão essencialmente concentradas no embrião e na camada da aleurona. As gliadinas e gluteninas são proteínas de reserva localizadas no endosperma. Devido ao seu elevado teor em prolina e glutamina, estas duas classes de proteínas são genericamente designadas por prolaminas, constituindo cerca de 80 % das proteínas totais do grão (Lafiandra e Kasarda, 1985; Shewry *et al.*, 1986).

Apesar da nomenclatura de Osborne ainda ser amplamente utilizada, atualmente considera-se mais correto classificar as proteínas de acordo com a sua função, nomeadamente proteínas de reserva, defesa, estruturais e metabólicas (Shewry e Halford, 2002).

As prolaminas (gluteninas e gliadinas) são fundamentais devido ao seu envolvimento na formação do glúten, embora do ponto de vista biológico não se lhes reconheça outra função além de proteínas de reserva (Shewry e Tatham, 1990), disponibilizando o azoto, carbono e enxofre necessários ao desenvolvimento da semente quando ocorre a germinação do embrião.

No grão do trigo, a proteína é acumulada lentamente nos tecidos do endosperma após a ântese. Nos primeiros 20 dias, 40 % da proteína é composta por gluteninas e gliadinas. Aos 45 dias o teor de proteína atinge o valor máximo (Clarke *et al.*, 2001).

As interações moleculares condicionam as propriedades funcionais das proteínas do glúten. Neste contexto, as gluteninas são as principais responsáveis pela elasticidade e força da massa, enquanto as gliadinas conferem viscosidade (Shewry *et al.*, 2006).

As gluteninas estão presentes no grão e posteriormente no glúten em polímeros de maior ou menor dimensão, estabilizados por diferentes tipos de ligações. A constituição dos polímeros deve-se fundamentalmente à formação de pontes bissulfeto. No entanto para além destas, existem outras forças agregativas, tais como as ligações de hidrogénio, as interações hidrófobas e as interações iónicas. As ligações de hidrogénio tornam-se importantes pela sua abundância, contribuindo de forma significativa para estabilizar os polímeros e conferir elasticidade (Belton, 1999). Quanto às interações hidrófobas a sua energia aumenta com o aumento da temperatura, o que pode eventualmente contribuir para uma estabilização adicional durante o desenvolvimento da massa (Wrigley *et al.*, 2006).

As gliadinas representam aproximadamente 50 % das proteínas do glúten. Estas proteínas estabilizam-se fundamentalmente por interações hidrófobas, ligações de hidrogénio e pontes bissulfeto.

Diversos estudos têm demonstrado que as condições ambientais, em particular a temperatura durante a fase de enchimento do grão e a fertilização, afetam significativamente a qualidade do glúten. A temperatura influencia o tempo em que ocorrem determinados factos durante o desenvolvimento do grão (Altenbach *et al.*, 2003). Quando associada a outros fatores pode provocar um incremento do teor proteico, devido a um efeito diferencial na deposição das proteínas e do amido, podendo conduzir a diferenças de composição proteica e qualidade (Dupont e Altenbach, 2003).

Corbellini *et al.* (1997) demonstraram que a ocorrência de temperaturas muito elevadas (35 - 40 °C) durante o enchimento do grão afeta significativamente a acumulação de matéria seca e de proteína.

As condições de fertilização, nomeadamente a disponibilidade de azoto e enxofre, afetam significativamente as quantidades dos diferentes tipos de proteínas. Uma fertilização abundante em azoto contribui para um aumento do teor proteico, no entanto não tem um efeito diferencial nas frações de gluteninas e gliadinas (Luo *et al.*, 2000; Triboi *et al.*, 2000; Altenbach *et al.*, 2002).

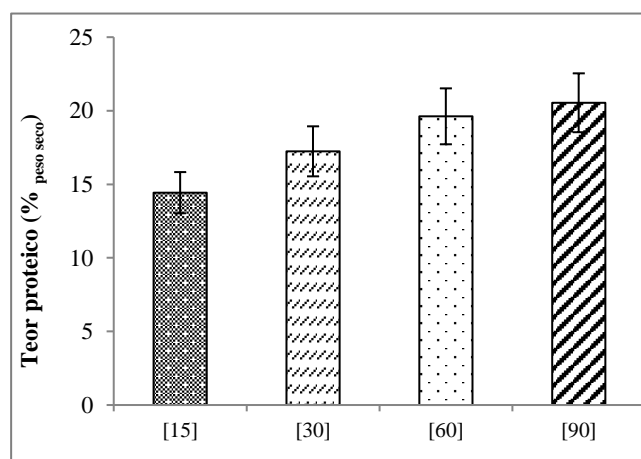
As proteínas são os componentes que mais influenciam a qualidade do trigo, quer pela sua quantidade (teor proteico), quer pelo tipo de proteínas (características das proteínas individuais). Estes aspetos constituem os principais determinantes da viscoelasticidade do glúten, pois condicionam o tamanho dos polímeros e as suas propriedades agregativas (Bagulho, 2008).

As gluteninas de baixa massa molecular (LMW-GS), mais concretamente as gluteninas controladas pelos genes do *locus Glu-B3*, são as que mais influenciam a força do glúten. Moreno (2011) estabeleceu inicialmente dois tipos de modelos de gluteninas LMW-GS (LMW-1 e LMW-2) em trigo duro. As gluteninas do tipo LMW-2 conferem um carácter mais forte ao glúten do que as gluteninas do tipo LMW-1 (Edwards *et al.*, 2007).

Quanto ao teor médio de proteínas no grão observou-se uma tendência crescente entre os diferentes tratamentos, tendo os mesmos oscilado entre 14,4 - 20,5 %, obtendo-se um valor máximo no tratamento 90 mL (Figura 3.55). Considerando que o teor médio de proteína no trigo duro usualmente oscila entre 12 - 16 % (INIAV, 2014), os nossos resultados encontram-se ligeiramente acima do intervalo estabelecido.

De acordo com um estudo realizado por Sapirstein *et al.* (2007), com utilização de onze genótipos de trigo duro cultivados sob condições ambientais idênticas, a determinação da proteína apresentou teores compreendidos entre 11,1 - 12,7 %. Estes autores demonstraram que as gluteninas de baixa massa molecular (LMW-GS) designadas LMW-1 e LMW-2 estão relacionadas, respetivamente, com uma inferior e superior qualidade de cozedura das massas. Adicionalmente Khan *et al.* (2013) sugeriram teores médios para a proteína em amostras de sêmola de trigo duro na ordem de 13,4 %.

Lidon *et al.* (2015) efetuaram um estudo com sementes de trigo mole, variedade Roxo para subsequente crescimento numa câmara de crescimento, em condições ambientais controladas. As sementes foram submetidas a diversos tratamentos de adubação com aplicação de uma solução nutritiva completa. Este ensaio de biofortificação realizou-se em condições bastante similares comparativamente com o nosso estudo. Estes autores reportaram um teor de proteína situado entre 11,0 - 17,3 %, encontrando-se os nossos resultados ligeiramente acima deste intervalo (Figura 3.55).



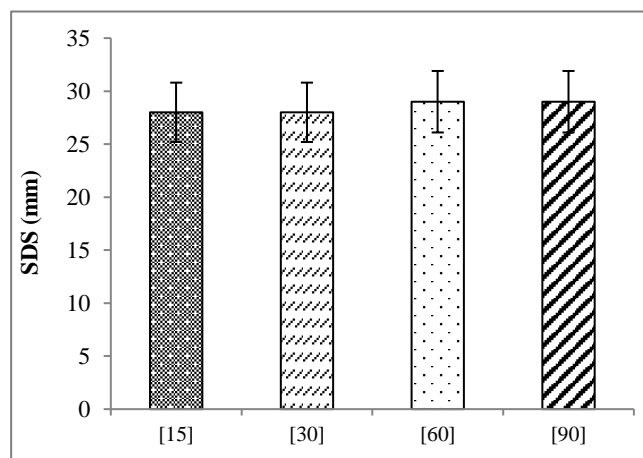
**Figura 3.55** – Teor médio de proteínas no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

### 3.1.4.5 Características tecnológicas

#### 3.1.4.5.1 Índice de sedimentação SDS

O índice de sedimentação SDS é vulgarmente utilizado em programas de melhoramento devido à pequena quantidade de amostra que necessita, dando uma boa estimativa da força do glúten (Axford *et al.*, 1978). A força do glúten define a qualidade industrial do trigo duro, sendo por isso uma ferramenta bastante utilizada pelos melhoradores. Na determinação deste índice não há interferência do grau de extração da sêmola podendo ser utilizado para a sêmola integral (Almeida, 2007). Os fenómenos biofísicos da sêmola, incluindo a interação proteína-amido e a extensão da rede do glúten, podem ser responsáveis pelas alterações nos volumes de sedimentação SDS, existindo assim, uma correlação do volume de sedimentação com a dureza do grão e, portanto, com o amido danificado (Carver, 1993).

Quanto ao teor médio de SDS no grão observou-se uma tendência crescente entre os diferentes tratamentos, tendo os mesmos oscilado entre 28 - 29 mm, obtendo-se um valor máximo nos tratamentos 60 mL e 90 mL (Figura 3.56). O teor médio de SDS expectável no trigo duro deverá ser superior a 50 mm (INIAV, 2014), porém os nossos resultados apontaram para uma faixa substancialmente inferior ao teor considerado. Lidon *et al.* (2015) observaram que o índice de sedimentação SDS se situava entre 53 – 64 mm, para o caso de sementes de trigo mole, variedade Roxo, valores substancialmente elevados face aos resultados por nós obtidos.

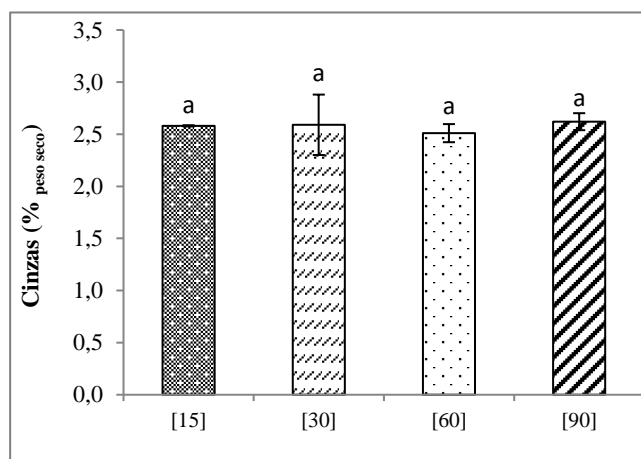


**Figura 3.56** – Volume de sedimentação (SDS) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

### 3.1.4.5.2 Cinzas

A cinza consiste no resíduo inorgânico obtido após a incineração ou calcinação do material. Os minerais concentram-se nas camadas mais externas da semente, particularmente na camada de aleurona e no pericarpo em quantidades reduzidas ou vestigiais. O teor de minerais na semente está relacionado com inúmeros fatores, tais como o genótipo, o tipo de solo e as práticas culturais (Alonso *et al.*, 1997; Posner, 2000). O teor de cinzas por si só não está relacionado com a qualidade do produto, mas fornece indicações sobre o grau de extração. A variação no conteúdo de cinzas indica diferentes propriedades de moagem (Gutkoski *et al.*, 2003).

Quanto ao teor de cinzas no grão de trigo não se verificaram diferenças significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre os valores médios dos diferentes tratamentos, ocorrendo um valor máximo de 2,62 %, no tratamento 90 mL (Figura 3.57). O teor de cinzas no trigo duro é usualmente inferior a 1,8 % (INIAV, 2014). Segundo Sapirstein *et al.* (2007), os teores de cinzas oscilaram entre 0,64 - 0,76 %. Também Khan *et al.* (2013) sugeriram teores médios de cinzas em amostras de sêmola de trigo duro de cerca de 1,19 %. Adicionalmente Armanino e Festa (1996) referem num estudo realizado com 195 amostras de trigo duro e trigo mole que o teor de cinzas nas mesmas oscila entre 1,3 - 1,6 %, percentagens substancialmente inferiores às descritas neste estudo (Figura 3.57).



**Figura 3.57** – Teor médio de cinzas no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento. A letra *a* indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos.

Lidon *et al.* (2015) também realizaram um estudo com sementes de trigo mole, variedade Roxo, para subsequente crescimento numa câmara de crescimento, em condições ambientais controladas. Este ensaio de biofortificação realizou-se em condições bastante similares comparativamente com o nosso estudo. Estes autores consideraram que o teor de cinzas se situa entre 1,45 e 2,35 %. Tal como no nosso estudo, também estes autores detetaram



valores superiores ao limite legal estabelecido (1,8 %), proveniente do incremento dos elementos minerais na sua totalidade, com contributo maioritário dos macronutrientes.

### 3.1.4.5.3 Cor

A luminosidade e o amarelecimento são duas das medidas de cores utilizadas em trigo. A luminosidade é influenciada pelo teor de farelo e está diretamente relacionada com o teor de cinzas. O amarelecimento é o resultado da quantidade de pigmentos naturais presentes. Para além destes existem outros fatores determinantes na cor, como o teor de proteína das amostras, a dureza dos grãos e o efeito da moagem, que interfere diretamente no teor de cinzas e na granulometria das partículas (Souza *et al.*, 2004).

A partir dos dados fornecidos pelo sistema CIEL\*a\*b\* é possível especificar alguns atributos de qualidade da sêmola através da análise conjunta da cor e das suas características físico-químicas (Silva, 2003). Segundo Miranda *et al.* (2005) a luminosidade L\* pode ser relacionada com a qualidade da sêmola, indicativa da intensidade da cor branca.

Normalmente cada moageiro estabelece padrões para a cor das farinhas que produz, sendo que a maioria considera uma farinha branca aquela que apresenta valores de L\* superiores a 94, coordenada a\* próxima de zero (valor negativo ou positivo) e coordenada b\* em torno de +8 (Ortolan, 2006). A coordenada L\* representa quão claro ou escuro é o produto, com valores entre 0 (preto) e 100 (branco).

No tratamento 90 mL a coordenada b\* sofreu um incremento significativo, indicando assim uma tendência para o amarelo. A cor amarela das sêmolas de trigo é determinada pela presença de carotenoides (Oliver *et al.*, 1993). Mares e Campbell (2001) verificaram que o conteúdo de xantofila, carotenoide responsável pela coloração amarela, está relacionado com a coordenada b\* da cor, sendo fortemente hereditário. Trigos cultivados em locais com maior radiação solar apresentam maior teor de carotenoides, podendo relacionar-se com o mecanismo de proteção da planta, que em resposta ao *stress* acumula pigmentos para se proteger da radiação UV e da elevada intensidade da luz (Pourcel *et al.*, 2007).

Sêmolas com coloração mais amarela são indicadas para a confeção de determinados produtos alimentícios, como massas. Contudo, para a confeção de pães a cor amarela deve ter um valor mínimo possível (não pigmentada) para causar a menor interferência no aspeto visual do produto, sendo preferível sêmolas com valores de coordenada b\* abaixo de 8,0 (Tonon, 2010).

As sêmolas avaliadas neste estudo apresentaram tendência para a cor amarela (L\* < 93; b\* > 10). De facto, cada amostra absorve e reflete a luz das diferentes porções do espectro (relacionadas com as coordenadas a\* e b\*) em diferentes quantidades, produzindo assim

diferentes tons. Symons e Dexter (1991) utilizando o sistema CIEL\*a\*b\* em farinhas de trigo de primavera do Canadá, encontraram intervalos de  $L^* = 90,3 - 92,4$ ;  $a^* = 0,94 - 0,99$ ;  $b^* = 9,9 - 13,3$ . Os valores encontrados por estes autores distanciam-se dos resultados obtidos neste estudo.

Lang *et al.* (1998) verificaram que variedades de trigo que continham elevados teores de proteínas apresentaram colorações com tendência para o escuro, ou seja, a cor da sêmola e dos seus derivados foi influenciada pela proteína. Comparando os diferentes tratamentos, o mesmo foi observado para o tratamento 90 mL, onde a sêmola apresentou um elevado teor de proteína, elevado valor de  $b^*$  e menor valor de  $L^*$ , indicativo da cor amarela.

Sêmolas mais claras são produzidas por grãos de textura mais macia e com menor força de glúten. Sêmolas mais escuras podem apresentar qualidade de panificação superior, pois são obtidas geralmente por trigos de endosperma mais duro e com maior força de glúten (Ortolan, 2006).

Quanto à luminosidade ( $L^*$ ) das amostras em estudo (Tabela 3.44), o valor mais elevado verificou-se no tratamento 30 mL (75,25). O menor valor foi observado nos tratamentos 15 mL e 60 mL (73,21). Para as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  de cromaticidade observaram-se diferenças significativas para ambos os parâmetros. Relativamente ao parâmetro  $a^*$  o valor mais elevado ocorreu no tratamento 90 mL (3,21) e o valor mais baixo foi observado no tratamento controlo (2,66). Para o parâmetro  $b^*$  observou-se o valor mais elevado no tratamento 90 mL (20,22) e o valor mais reduzido no tratamento 60 mL (17,77).

A determinação da cor (Tabela 3.44) identifica as amostras referentes aos tratamentos 15 mL e 60 mL com menor luminosidade, sugerindo que estas são mais escuras que as restantes. E as amostras referentes aos tratamentos 30 mL e 90 mL são tidas como as mais claras. Adicionalmente, verificou-se uma maior contribuição do vermelho ( $+a^*$ ) em relação ao verde ( $-a^*$ ) na tonalidade da maioria das amostras, assim como do amarelo ( $+b^*$ ) em relação ao azul ( $-b^*$ ).

**Tabela 3.44** – Parâmetros colorimétricos das amostras, com a respetiva análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %), para cada tratamento. Os valores apresentados correspondem à média dos parâmetros colorimétricos e respetivo erro padrão. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada parâmetro colorimétrico.

Parâmetro	[15]	[30]	[60]	[90]
$L^*$	73,21 $\pm$ 0,317 a	75,25 $\pm$ 2,138 a	73,21 $\pm$ 0,290 a	73,51 $\pm$ 0,153 a
$a^*$	2,66 $\pm$ 0,187 b	2,67 $\pm$ 0,031 b	2,72 $\pm$ 0,058 b	3,21 $\pm$ 0,092 a
$b^*$	18,91 $\pm$ 0,681 a,b	18,39 $\pm$ 0,755 a,b	17,77 $\pm$ 0,196 b	20,22 $\pm$ 0,338 a

## **Biofortificação em estufa**

---

## 3.2. Biofortificação em estufa

### 3.2.1 Composição do grão

#### 3.2.1.1 Elementos minerais

Os teores de ferro não variaram de forma significativa entre os diferentes tratamentos, embora nos tratamentos 60 mL e 90 mL tenham subsistido valores mais elevados (Figura 3.58; Tabela 3.45). Os teores de cobre variaram significativamente entre os diferentes tratamentos, obtendo-se um valor máximo no tratamento 90 mL. Relativamente ao manganês detetaram-se diferenças significativas em todos os tratamentos, verificando-se que a concentração significativamente mais elevada ocorreu no tratamento 90 mL. Os níveis de zinco apenas mostraram uma variação significativa no tratamento 90 mL, no qual se observou a concentração mais elevada.

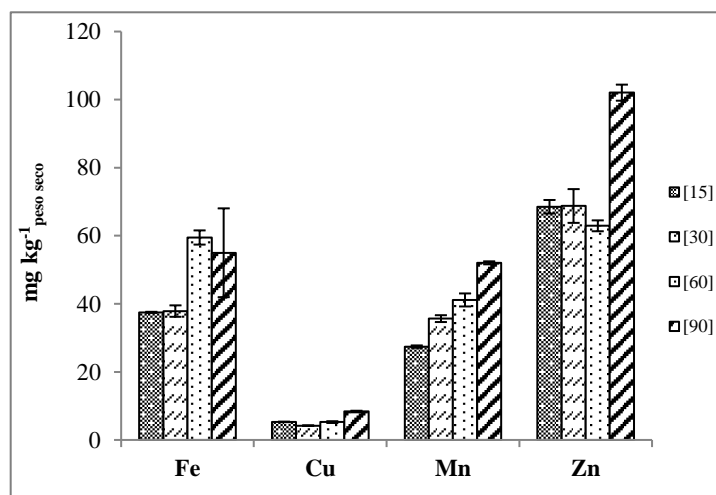


Figura 3.58 – Concentração de micronutrientes no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

Tabela 3.45 – Média da concentração de micronutrientes no grão ( $\text{mg kg}^{-1}$  peso seco), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) para cada concentração. As letras a, b, c, d indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada elemento mineral.

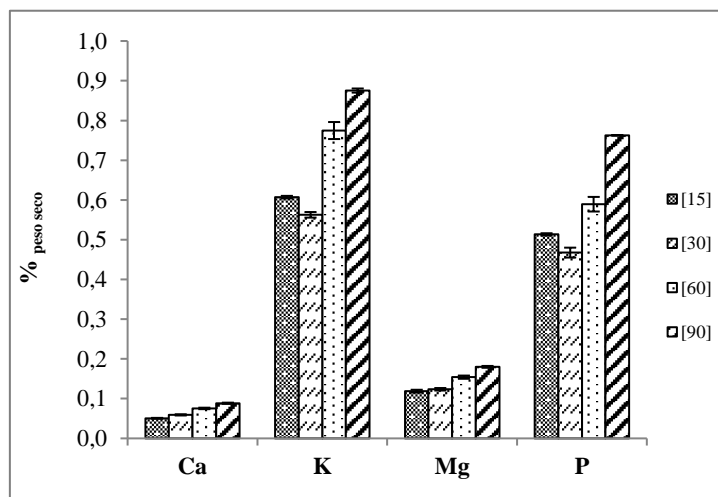
Micronutrientes	[15]	[30]	[60]	[90]
Fe	37,50 ± 0,153 a	37,87 ± 1,680 a	59,49 ± 2,085 a	55,00 ± 13,048 a
Cu	5,29 ± 0,083 b	4,21 ± 0,060 c	5,25 ± 0,261 b	8,36 ± 0,230 a
Mn	27,42 ± 0,348 d	35,65 ± 1,003 c	41,14 ± 1,910 b	52,04 ± 0,440 a
Zn	68,53 ± 1,979 b	68,74 ± 4,963 b	62,92 ± 1,599 b	102,04 ± 2,358 a

Paralelamente ao crescimento em ambiente controlado, os teores de ferro em estufa atingiram um valor máximo de  $59,5 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco no tratamento 60 mL. Por oposição, o cobre obteve um valor máximo de  $9,7 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco no tratamento 30 mL em ambiente controlado e de  $8,4 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco no tratamento 90 mL em estufa. Quanto ao manganês obteve-se um valor máximo de  $90,3 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco no tratamento 60 mL em ambiente controlado e de  $52,0 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco no tratamento 90 mL, em estufa. Por sua vez, para o zinco prevaleceu um teor máximo de  $132,5 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco no tratamento 60 mL em ambiente controlado e de  $102,0 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco no tratamento 90 mL, em estufa.

Neste enquadramento, face à nutrição com microelementos, evidencia-se que em ambiente controlado as plantas responderam de forma mais acentuada ao tratamento 60 mL e em estufa ao tratamento 90 mL.

Considerando valores obtidos em estufa, ainda que com genótipos e condições ambientais diferenciadas, Cakmak *et al.* (2004) detetaram valores compreendidos entre 21 -  $91 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco para o ferro, com um valor médio de  $48 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco, situando-se os teores de zinco entre 14 -  $190 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco, com um valor médio de  $88 \text{ mg Zn kg}^{-1}$  peso seco.

Os teores de cálcio variaram de forma significativa, ocorrendo nos tratamentos 60 mL e 90 mL valores significativamente mais elevados (Figura 3.59; Tabela 3.46). Os teores de potássio, magnésio e fósforo, não apresentaram variações significativas, com exceção dos tratamentos 60 mL e 90 mL, observando-se nestes casos valores significativamente mais elevados.



**Figura 3.59** – Concentração de macronutrientes no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

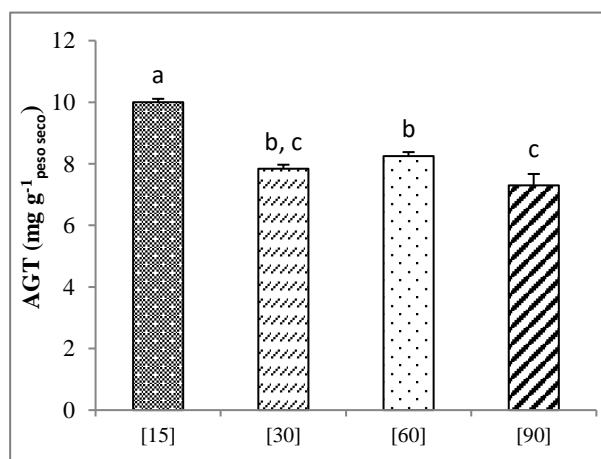
**Tabela 3.46** – Média da concentração de macronutrientes no grão (% <sub>peso seco</sub>), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) para cada tratamento. As letras *a, b, c, d* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada elemento mineral.

Macronutrientes	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>Ca</b>	0,05 ± 0,001 d	0,06 ± 0,002 c	0,08 ± 0,002 b	0,09 ± 0,002 a
<b>K</b>	0,61 ± 0,003 c	0,56 ± 0,007 c	0,77 ± 0,021 b	0,88 ± 0,005 a
<b>Mg</b>	0,12 ± 0,004 c	0,12 ± 0,003 c	0,15 ± 0,004 b	0,18 ± 0,002 a
<b>P</b>	0,51 ± 0,003 c	0,47 ± 0,012 c	0,59 ± 0,018 b	0,76 ± 0,000 a

Paralelamente ao crescimento em ambiente controlado, os teores de cálcio em estufa atingiram um valor máximo de 0,09 % <sub>peso seco</sub> no tratamento 90 mL. Por oposição, o potássio obteve um valor máximo de 8,65 g kg<sup>-1</sup> <sub>peso seco</sub> no tratamento 30 mL em ambiente controlado e de 0,88 % <sub>peso seco</sub> no tratamento 90 mL em estufa. Quanto ao magnésio subsistiu um valor máximo de 1,91 g kg<sup>-1</sup> <sub>peso seco</sub> no tratamento 30 mL em ambiente controlado e de 0,18 % <sub>peso seco</sub> no tratamento 90 mL, em estufa. Por sua vez, para o fósforo prevaleceu um teor máximo de 7,47 g kg<sup>-1</sup> <sub>peso seco</sub> no tratamento 60 mL em ambiente controlado e de 0,76 % <sub>peso seco</sub> no tratamento 90 mL, em estufa. Neste contexto evidencia-se que em ambiente controlado as plantas responderam de forma mais acentuada aos tratamentos 30 mL e 60 mL e em estufa ao tratamento 90 mL.

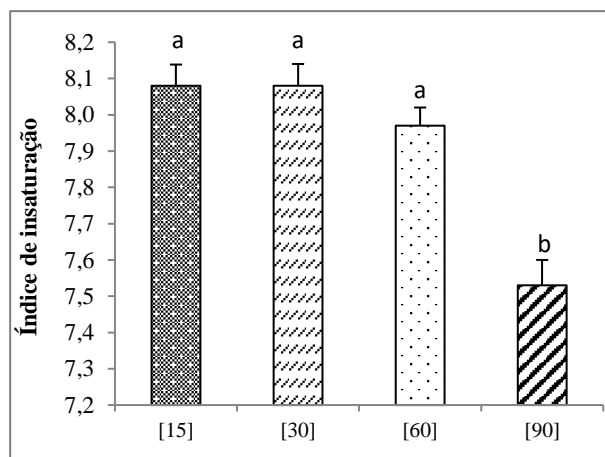
### 3.2.1.2 Fração lipídica total e composição em ácidos gordos

No grão, apenas o tratamento controlo apresentou variações significativas, ocorrendo nos tratamentos 90 mL e 15 mL teores de ácidos gordos totais (AGT) mínimo e máximo (7,30 – 10,00 mg g<sup>-1</sup> <sub>peso seco</sub>), respetivamente (Figura 3.60). Os tratamentos 15 mL e 60 mL apresentaram ainda teores mais elevados face aos restantes.

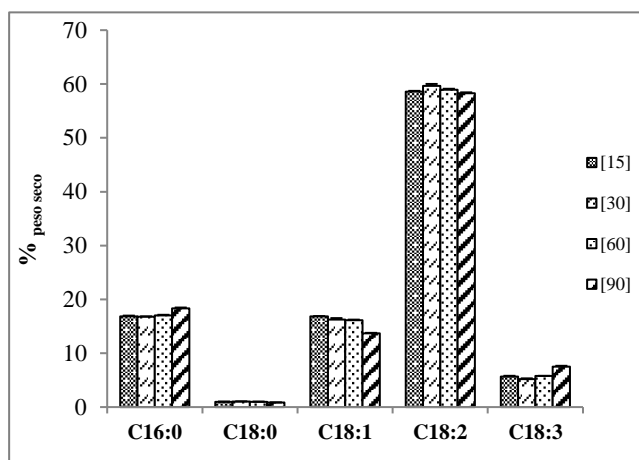


**Figura 3.60** – Ácidos gordos totais (AGT) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. As letras *a, b, c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos estudados.

Quanto ao índice de insaturação (DBI) observou-se uma variação significativa no tratamento 90 mL, tendo os teores oscilado entre 7,53 – 8,08 (Figura 3.61).



**Figura 3.61** – Índice de insaturação (DBI) no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos estudados.  $DBI = [(\% \text{ monoenes} + 2x \% \text{ dienes} + 3x \% \text{ trienes}) / (\% \text{ ácidos gordos saturados})]$  (Mazliak, 1983).



**Figura 3.62** – Percentagem dos ácidos gordos mais abundantes (> 0,5 %) no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.

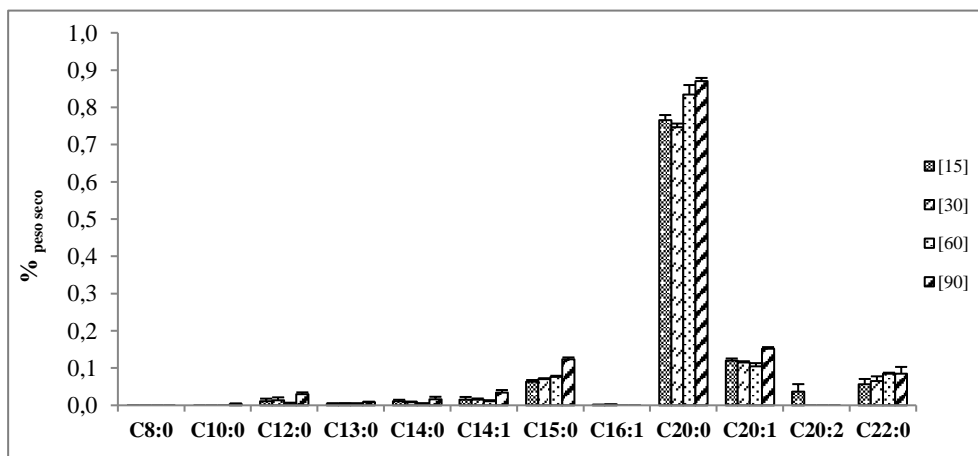
**Tabela 3.47** – Média da percentagem dos ácidos gordos mais abundantes (> 0,5 %), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) para cada tratamento. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo.

Ácidos Gordos	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>C16:0</b>	16,82 ± 0,163 b	16,79 ± 0,060 b	17,03 ± 0,110 b	18,33 ± 0,160 a
<b>C18:0</b>	0,99 ± 0,036 a	1,04 ± 0,018 a	0,98 ± 0,039 a	0,86 ± 0,011 b
<b>C18:1</b>	16,85 ± 0,054 a	16,25 ± 0,270 a,b	16,14 ± 0,104 b	13,69 ± 0,096 c
<b>C18:2</b>	58,59 ± 0,137 b	59,67 ± 0,340 a	58,96 ± 0,152 a,b	58,27 ± 0,177 b
<b>C18:3</b>	5,67 ± 0,142 b,c	5,21 ± 0,126 c	5,77 ± 0,028 b	7,53 ± 0,139 a

Quanto à composição qualitativa dos ácidos gordos (Figura 3.62; Tabela 3.47), destacaram-se, pela sua abundância, os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3), com percentagens que oscilaram entre 0,86 - 59,67 %. Num estudo realizado por Farcas *et al.* (2015) foram identificados 26 ácidos gordos em amostras de farinha de trigo, sendo os mais abundantes os ácidos linoleico, palmítico e oleico.

Os ácidos palmítico e esteárico apresentaram uma variação significativa no tratamento 90 mL. Relativamente aos ácidos oleico, linoleico e linolénico verificaram-se diferenças significativas ao longo dos tratamentos, observando-se um valor máximo de 16,85 %, 59,67 % e 7,53 %, respetivamente.

Farcas *et al.* (2015) observaram que dos ácidos gordos totais presentes na farinha de trigo 19 % corresponde ao ácido palmítico (C16:0), 1,2 % para o ácido esteárico (C18:0), 11,6 % para o ácido oleico (C18:1), 63,8 % relativamente ao ácido linoleico (C18:2) e cerca de 2,6 % para o ácido linolénico (C18:3). No nosso caso (Figura 3.62; Tabela 3.47), com exceção dos ácidos oleico e linolénico que apresentam valores percentuais mais elevados, os restantes ácidos gordos apresentam valores concordantes com Farcas *et al.* (2015).



**Figura 3.63** – Percentagem dos ácidos gordos menos representativos (< 1 %) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento e ácido gordo.



**Tabela 3.48** – Média da percentagem dos ácidos gordos menos representativos (< 1 %), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) para cada tratamento. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo.

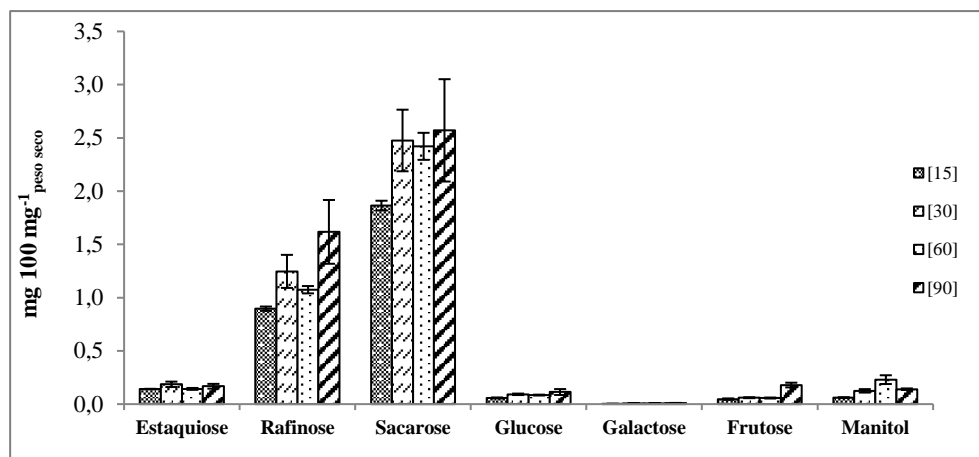
Ácidos Gordos	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>C8:0</b>	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
<b>C10:0</b>	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,002 a
<b>C12:0</b>	0,01 ± 0,007 a,b	0,01 ± 0,008 a,b	0,00 ± 0,003 b	0,03 ± 0,005 a
<b>C13:0</b>	0,00 ± 0,002 a	0,01 ± 0,000 a	0,00 ± 0,001 a	0,01 ± 0,001 a
<b>C14:0</b>	0,01 ± 0,004 a	0,01 ± 0,002 a	0,00 ± 0,001 a	0,02 ± 0,007 a
<b>C14:1</b>	0,02 ± 0,007 a,b	0,02 ± 0,003 a,b	0,01 ± 0,003 b	0,03 ± 0,007 a
<b>C15:0</b>	0,06 ± 0,004 b	0,07 ± 0,003 b	0,08 ± 0,003 b	0,12 ± 0,005 a
<b>C16:1</b>	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
<b>C20:0</b>	0,77 ± 0,014 b	0,75 ± 0,010 b	0,83 ± 0,026 a	0,87 ± 0,008 a
<b>C20:1</b>	0,12 ± 0,005 b	0,12 ± 0,003 b	0,10 ± 0,009 b	0,15 ± 0,004 a
<b>C20:2</b>	0,04 ± 0,020 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
<b>C22:0</b>	0,06 ± 0,014 a	0,07 ± 0,012 a	0,08 ± 0,003 a	0,08 ± 0,019 a

Destacaram-se como ácidos gordos menos representativos (< 1 %) no grão (Figura 3.63; Tabela 3.48), os ácidos caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0), tridecanóico (C13:0), mirístico (C14:0), miristoléico (C14:1), pentadecanóico (C15:0), palmitoleico (C16:1), aráquico (C20:0), gadoleico (C20:1), eicosadienoico (C20:2) e behénico (C22:0), com percentagens que oscilaram entre 0,00 - 0,87 %, tal como indicado anteriormente por outros autores (Farcas *et al.*, 2015).

Nenhum dos ácidos gordos apresentou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, à exceção dos ácidos láurico (C12:0), miristoléico (C14:1), pentadecanóico (C15:0), aráquico (C20:0) e gadoleico (C20:1), observando-se valores máximos de 0,03 %, 0,03 %, 0,12 %, 0,87 % e 0,15 %, respetivamente no tratamento 90 mL.

### 3.2.1.3 Glícidos

Dos açúcares solúveis analisados, os mais abundantes no grão de trigo duro foram a estaquiose, rafinose e sacarose. Por oposição, a glucose, galactose, frutose e manitol encontraram-se entre os menos abundantes (Figura 3.64; Tabela 3.49).



**Figura 3.64** – Teor médio de glúcidos no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

**Tabela 3.49** – Média do teor de glúcidos no grão (mg 100 mg<sup>-1</sup> peso seco), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) para cada tratamento. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada glúcido.

Glúcidos	[15]	[30]	[60]	[90]
Estaquiase	0,14 ± 0,002 a	0,19 ± 0,025 a	0,14 ± 0,009 a	0,17 ± 0,022 a
Rafinose	0,90 ± 0,020 b	1,25 ± 0,155 a,b	1,07 ± 0,034 a,b	1,62 ± 0,299 a
Sacarose	1,87 ± 0,045 a	2,48 ± 0,289 a	2,42 ± 0,127 a	2,57 ± 0,480 a
Glucose	0,06 ± 0,005 a	0,09 ± 0,007 a	0,09 ± 0,004 a	0,11 ± 0,028 a
Galactose	0,00 ± 0,001 a	0,01 ± 0,001 a	0,01 ± 0,001 a	0,01 ± 0,002 a
Frutose	0,05 ± 0,007 b	0,06 ± 0,004 b	0,06 ± 0,005 b	0,18 ± 0,022 a
Manitol	0,06 ± 0,004 b	0,12 ± 0,016 b	0,23 ± 0,041 a	0,14 ± 0,007 a,b

Quanto à estaquiase, sacarose, glucose e galactose não se verificaram variações significativas entre os diferentes tratamentos, atingindo um valor máximo de 0,19, 2,57, 0,11 e 0,01 mg 100 mg<sup>-1</sup> peso seco, respetivamente (Figura 3.64; Tabela 3.49). Os teores de rafinose variaram significativamente entre os diferentes tratamentos, obtendo-se um valor máximo no tratamento 90 mL. Os níveis de frutose apenas mostraram uma variação significativa no tratamento 90 mL, no qual se observou a concentração mais elevada. Relativamente ao manitol, observou-se uma variação significativa no tratamento 60 mL, prevalecendo neste caso uma concentração mais elevada.

Stuknytė *et al.* (2014) propõem teores de glucose em amostras de esparguete entre 0,03 - 0,6 mg 100 mg<sup>-1</sup> peso seco, encontrando-se em conformidade com os resultados obtidos. Kurdziel *et al.* (2015) em grãos de quatro variedades de trigo (*Triticum aestivum*), também verificaram que o embrião continha teores mais elevados de glucose, frutose, sacarose e rafinose comparativamente com o endosperma, o qual continha quantidades mais elevadas de maltose. Estes autores reportaram teores médios oscilando entre 0,5 - 1,0 mg 100 mg<sup>-1</sup> peso seco para a glucose, 0,2 - 0,5 mg 100 mg<sup>-1</sup> peso seco para a frutose e 1,0 - 2,0 mg 100 mg<sup>-1</sup> peso seco para a rafinose, constituindo valores substancialmente superiores aos obtidos no nosso estudo.

### 3.2.1.4 Proteínas e fração azotada

Quanto ao teor médio de proteínas no grão observou-se uma tendência crescente entre os diferentes tratamentos, tendo os mesmos oscilado entre 17,1 - 20,0 % peso seco, obtendo-se um valor máximo no tratamento 60 mL (Figura 3.65). O teor médio de proteína no trigo duro oscila entre 12 - 16 % peso seco (INIAV, 2014). Confrontando os resultados obtidos, estes encontram-se ligeiramente acima do intervalo estabelecido.

Grãos de trigo mole e duro obtidos após crescimento controlado em estufa (Dias *et al.*, 2008) apresentaram teores compreendidos entre 15,85 - 17,43 % peso seco, valores substancialmente mais baixos do que os verificados neste estudo (Figura 3.65).

A relação inversa entre o incremento do teor de proteína e o decréscimo do índice de sedimentação SDS encontra-se de acordo com os resultados obtidos por Novaro *et al.* (1997) e Rharrabti *et al.* (2003). Durante o enchimento do grão, as alterações no teor de proteína associadas a elevadas temperaturas (> 30 °C) têm sido relacionadas a quebras no índice de sedimentação SDS, promovendo um decréscimo na força do glúten.

Dados obtidos em diversos estudos realizados no campo e confirmados em ambiente controlado (Blumenthal *et al.*, 1993; Stone e Nicolas, 1994; Wrigley *et al.*, 1994; Panozzo e Eagles, 2000), indicaram que alguns dias com temperaturas máximas diárias superiores a 32 °C, contribuem para a produção de grãos com massa mais fraca.

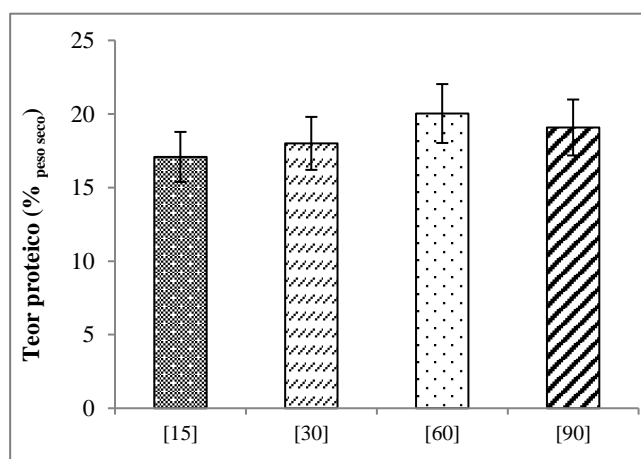
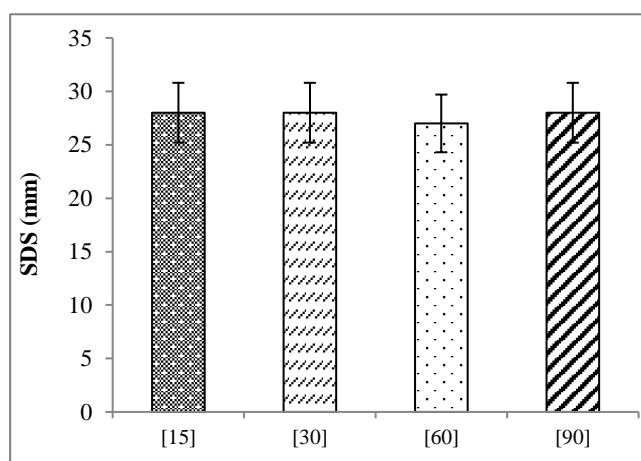


Figura 3.65 – Teor médio de proteínas no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

### 3.2.1.5 Características tecnológicas

#### 3.2.1.5.1 Índice de sedimentação SDS

Observou-se que os teores médios de SDS no grão de trigo duro permaneceram praticamente constantes (entre 27 – 28 mm) independentemente dos diferentes tratamentos (Figura 3.66), valores claramente inferiores aos referidos pelo INIAV (2004) que devem ser superiores a 50 mm. Contudo Dias *et al.* (2008) observaram em sementes de trigo mole e duro valores de SDS muito semelhantes aos nossos (28 – 30 mm).

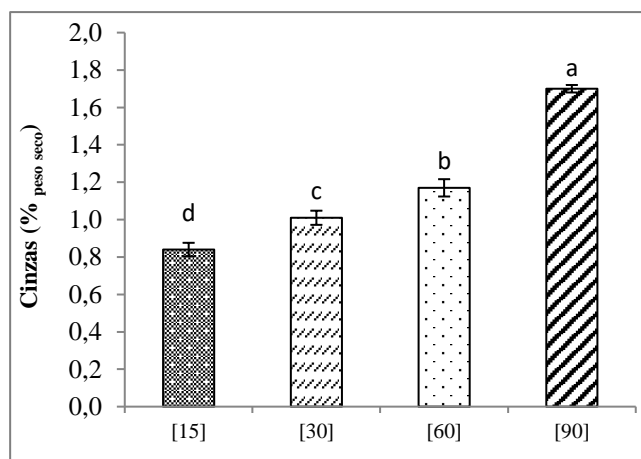


**Figura 3.66** – Volume de sedimentação (SDS) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

#### 3.2.1.5.2 Cinzas

Quanto ao teor de cinzas é possível observar variações significativas, tendo os teores oscilado entre 0,84 - 1,70 %. Denota-se um incremento significativo ao longo dos tratamentos, obtendo-se um valor máximo no tratamento 90 mL (Figura 3.67). O teor de cinzas no trigo duro deve ser inferior a 1,8 % (INIAV, 2014).

Torbica *et al.* (2011) referem num estudo realizado com amostras de farinha de trigo mole e sêmola de trigo duro que o teor de cinzas nas mesmas oscila entre 0,4 - 1,8 %. Neste enquadramento verificou-se que os resultados obtidos neste estudo (Figura 3.67) se encontram em conformidade com os valores descritos por estes autores. Boyacioglu e D'Appolonia (1994) sugeriram ainda teores médios de cinzas em amostras de sêmola de trigo duro e farinha comercial de cerca de 0,75 e 0,43 %, respetivamente.



**Figura 3.67** – Teor médio de cinzas no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. As letras *a*, *b*, *c*, *d* indicam diferenças significativas entre os tratamentos estudados.

### 3.2.1.5.3 Cor

Dos parâmetros colorimétricos analisados, a luminosidade ( $L^*$ ) das amostras em estudo (Tabela 3.50), apresentou o valor mais elevado no tratamento 60 mL (74,80). O menor valor foi observado no tratamento 90 mL (71,35). Para a coordenada  $a^*$  de cromaticidade constatarem-se diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Contrariamente, para a coordenada  $b^*$  não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes sêmolas de trigo duro. Relativamente ao parâmetro  $a^*$  o valor mais elevado ocorreu no tratamento 30 mL (3,86) e o valor mais baixo foi observado no tratamento controlo (2,87). Para o parâmetro  $b^*$  observou-se o valor mais elevado no tratamento 90 mL (21,05) e o valor mais reduzido no tratamento controlo (19,91).

A determinação da cor (Tabela 3.50) identifica as amostras referentes ao tratamento 90 mL com menor luminosidade, sugerindo que estas são mais escuras que as restantes. E as amostras referentes aos tratamentos 15 mL, 30 mL e 60 mL são tidas como as mais claras. Adicionalmente, verificou-se uma maior contribuição do vermelho ( $+a^*$ ) em relação ao verde ( $-a^*$ ) na tonalidade da maioria das amostras, assim como do amarelo ( $+b^*$ ) em relação ao azul ( $-b^*$ ). Esta é uma técnica não destrutiva de avaliação do índice de biofortificação entre as diferentes amostras em estudo.

**Tabela 3.50** – Parâmetros colorimétricos das amostras, com a respetiva análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ), para cada tratamento. Os valores apresentados correspondem à média dos parâmetros colorimétricos e respetivo erro padrão. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada parâmetro colorimétrico.

Parâmetro	[15]	[30]	[60]	[90]
<b>L*</b>	73,95 ± 1,135 a,b	73,03 ± 0,317 a,b	74,80 ± 0,892 a	71,35 ± 0,486 b
<b>a*</b>	2,87 ± 0,096 b	3,86 ± 0,196 a	2,90 ± 0,168 b	3,77 ± 0,050 a
<b>b*</b>	19,91 ± 0,282 a	20,88 ± 0,564 a	20,02 ± 0,903 a	21,05 ± 0,477 a

## **Biofortificação em campo**

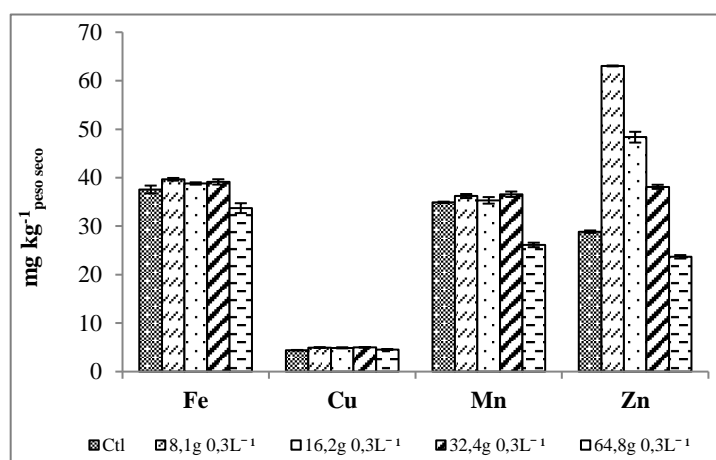
---

### 3.3. Biofortificação em campo

#### 3.3.1 Composição do grão

##### 3.3.1.1 Elementos minerais

As concentrações de ferro, cobre e manganês apenas mostraram uma variação significativa no tratamento 64,8 g 0,3 L<sup>-1</sup> (Figura 3.68; Tabela 3.51). Quanto ao zinco, as concentrações observadas eram significativamente diferentes, independentemente dos tratamentos, variando entre um valor mínimo de 23,68 e 63,05 mg kg<sup>-1</sup> peso seco.



**Figura 3.68** – Concentração de micronutrientes no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

**Tabela 3.51** – Média da concentração de micronutrientes no grão (mg kg<sup>-1</sup> peso seco), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) para cada tratamento. As letras *a*, *b*, *c*, *d*, *e* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada elemento mineral.

Micronutrientes	Ctl	8,1 g 0,3 L <sup>-1</sup>	16,2 g 0,3 L <sup>-1</sup>	32,4 g 0,3 L <sup>-1</sup>	64,8 g 0,3 L <sup>-1</sup>
Fe	37,57 ± 0,804 a	39,67 ± 0,278 a	38,80 ± 0,239 a	39,13 ± 0,548 a	33,72 ± 1,017 b
Cu	4,42 ± 0,052 b	4,96 ± 0,074 a	4,90 ± 0,114 a	5,01 ± 0,028 a	4,56 ± 0,073 b
Mn	34,89 ± 0,166 a	36,22 ± 0,415 a	35,32 ± 0,678 a	36,59 ± 0,557 a	26,13 ± 0,464 b
Zn	28,86 ± 0,251 d	63,05 ± 0,090 a	48,35 ± 1,111 b	38,12 ± 0,428 c	23,68 ± 0,357 e

As concentrações de ferro atingiram valores máximos de 50,2 e 59,5 mg kg<sup>-1</sup> peso seco em ambiente controlado e em estufa, respetivamente, no tratamento 60 mL, sendo que na cultura de campo a concentração mais elevada correspondeu apenas a 39,7 mg kg<sup>-1</sup> peso seco (estufa > ambiente controlado > campo). Quanto ao cobre obteve-se um valor máximo de 9,7 e 8,4 mg kg<sup>-1</sup> peso seco nos tratamentos 30 mL e 90 mL em ambiente controlado e em estufa,



respetivamente, enquanto no ensaio de campo a concentração mais elevada foi de  $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco (ambiente controlado > estufa > campo). Quanto ao manganês obteve-se um valor máximo de  $90,3$  e  $52,0 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco nos tratamentos  $60 \text{ mL}$  e  $90 \text{ mL}$  em ambiente controlado e em estufa, respetivamente, sendo a concentração mais elevada  $36,6 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco em cultura de campo (ambiente controlado > estufa > campo). No que respeita ao zinco prevaleceu um teor máximo de  $132,5 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco no tratamento  $60 \text{ mL}$  em ambiente controlado e de  $102,0 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco no tratamento  $90 \text{ mL}$  em estufa, sendo que em cultura de campo o teor mais elevado correspondeu a  $63,0 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco (ambiente controlado > estufa > campo). Analisando os resultados obtidos, podemos observar um decréscimo substancial nos diferentes elementos minerais no ensaio de campo face ao crescimento da cultura em ambiente controlado e em estufa. Considerando valores obtidos em ensaio de campo, ainda que com genótipos diferentes e condições ambientais diferenciadas, Cakmak *et al.* (2004) reportaram valores compreendidos entre  $15 - 109 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco para o ferro, com um valor médio de  $46 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco. De acordo com estes autores, os teores de zinco variaram entre  $30 - 118 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco, com um valor médio correspondente a  $61 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco.

Os níveis de cálcio e potássio não variaram de forma significativa entre os diferentes tratamentos (Figura 3.69; Tabela 3.52). Os teores de magnésio e fósforo apenas mostraram uma variação significativa no tratamento  $64,8 \text{ g } 0,3 \text{ L}^{-1}$ .

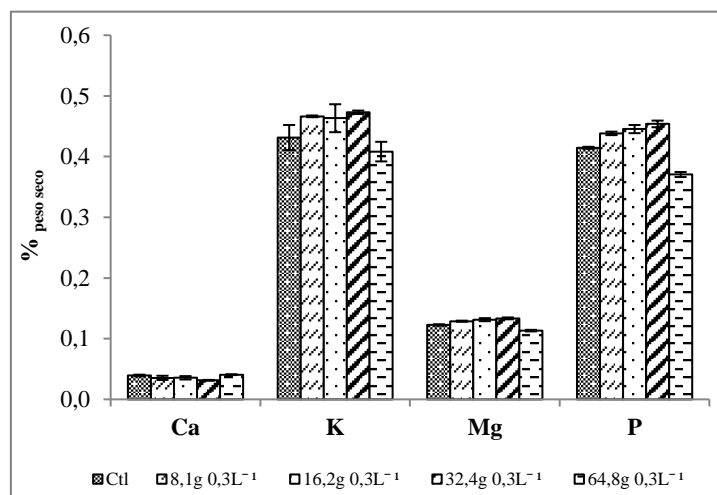


Figura 3.69 – Concentração de macronutrientes no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.

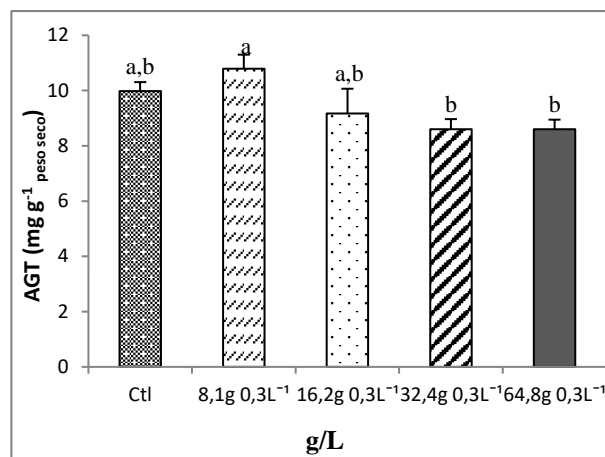
**Tabela 3.52** – Média da concentração de macronutrientes no grão (% peso seco), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) para cada tratamento. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada elemento mineral.

Macronutrientes	Ctl	8,1 g 0,3 L <sup>-1</sup>	16,2 g 0,3 L <sup>-1</sup>	32,4 g 0,3 L <sup>-1</sup>	64,8 g 0,3 L <sup>-1</sup>
<b>Ca</b>	0,04 ± 0,001 a	0,04 ± 0,003 a	0,04 ± 0,003 a	0,03 ± 0,001 a	0,04 ± 0,001 a
<b>K</b>	0,43 ± 0,021 a	0,47 ± 0,001 a	0,46 ± 0,023 a	0,47 ± 0,003 a	0,41 ± 0,016 a
<b>Mg</b>	0,12 ± 0,001 a	0,13 ± 0,001 a	0,13 ± 0,002 a	0,13 ± 0,002 a	0,11 ± 0,001 b
<b>P</b>	0,41 ± 0,002 b	0,44 ± 0,003 a	0,45 ± 0,007 a	0,45 ± 0,005 a	0,37 ± 0,004 c

Tal como para o crescimento da cultura em ambiente controlado e em estufa, os teores de cálcio atingiram um valor máximo de 0,09 % peso seco no tratamento 90 mL, sendo que em cultura de campo o valor mais elevado correspondeu a 0,04 % peso seco (estufa > campo). Por oposição, o potássio obteve um valor máximo de 8,65 g kg<sup>-1</sup> peso seco no tratamento 30 mL em ambiente controlado e de 0,88 % peso seco no tratamento 90 mL em estufa, sendo que em cultura de campo a concentração mais elevada diz respeito a 0,47 % peso seco (ambiente controlado > estufa > campo). Quanto ao magnésio subsistiu um valor máximo de 1,91 g kg<sup>-1</sup> peso seco no tratamento 30 mL em ambiente controlado e de 0,18 % peso seco no tratamento 90 mL, em estufa, sendo a concentração significativamente mais elevada referente a 0,13 % peso seco em cultura de campo (ambiente controlado > estufa > campo). No que respeita ao fósforo obteve-se um teor máximo de 7,47 g kg<sup>-1</sup> peso seco no tratamento 60 mL em ambiente controlado e de 0,76 % peso seco no tratamento 90 mL em estufa, sendo que em cultura de campo o teor mais elevado correspondeu a 0,45 % peso seco (ambiente controlado > estufa > campo).

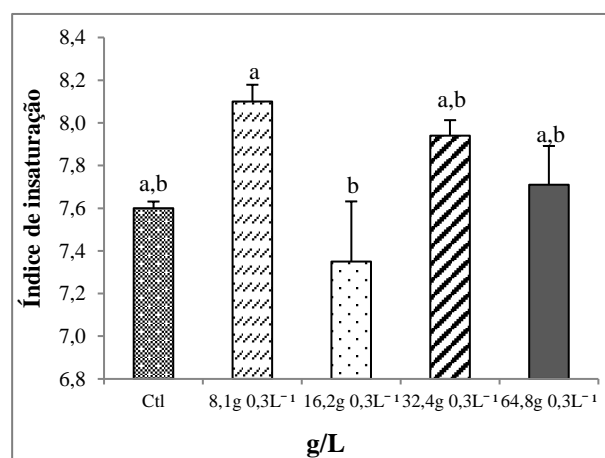
### 3.3.1.2 Fração lipídica total e composição em ácidos gordos

No grão, todos os tratamentos apresentaram variações significativas, ocorrendo nos tratamentos 64,8 g 0,3 L<sup>-1</sup> e 8,1 g 0,3 L<sup>-1</sup> teores de ácidos gordos totais (AGT) mínimo e máximo (8,60 - 10,79 mg g<sup>-1</sup> peso seco), respetivamente (Figura 3.70). Tendo em conta os tratamentos em estudo observou-se que os grãos do controlo e o tratamento 8,1 g 0,3 L<sup>-1</sup> apresentaram teores mais elevados face aos restantes.

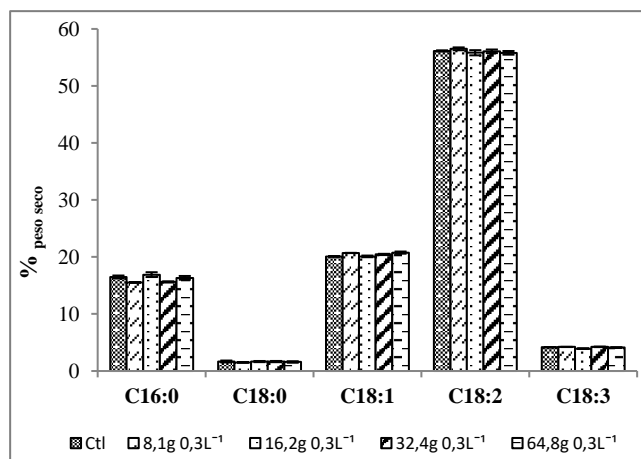


**Figura 3.70** – Ácidos gordos totais (AGT) no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

O índice de insaturação (DBI) também não revelou variações significativas entre os diferentes tratamentos, à exceção dos casos 8,1 g 0,3 L<sup>-1</sup> e 16,2 g 0,3 L<sup>-1</sup>, tendo os respetivos teores oscilado entre 7,35 - 8,10 (Figura 3.71).



**Figura 3.71** – Índice de insaturação (DBI) no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos estudados. DBI =  $[(\% \text{ monoenes} + 2 \times \% \text{ dienes} + 3 \times \% \text{ trienes}) / (\% \text{ ácidos gordos saturados})]$  (Mazliak, 1983).



**Figura 3.72** – Percentagem dos ácidos gordos mais abundantes (> 0,5 %) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

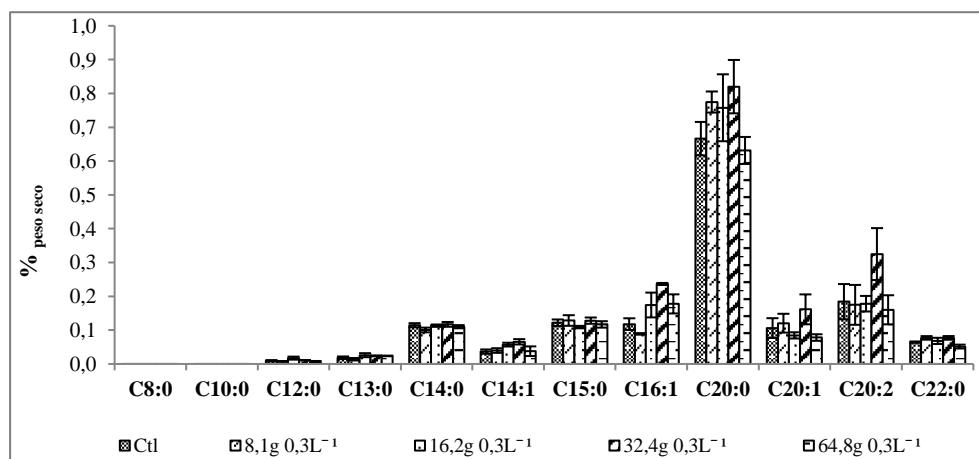
**Tabela 3.53** – Média da percentagem dos ácidos gordos mais abundantes (> 0,5 %), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) da percentagem dos ácidos gordos mais abundantes para cada concentração referente à última colheita. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo.

Ácidos Gordos	Ctl	8,1 g 0,3 L <sup>-1</sup>	16,2 g 0,3 L <sup>-1</sup>	32,4 g 0,3 L <sup>-1</sup>	64,8 g 0,3 L <sup>-1</sup>
<b>C16:0</b>	16,48 ± 0,269 a,b	15,53 ± 0,073 b	16,90 ± 0,421 a	15,62 ± 0,105 b	16,34 ± 0,327 a,b
<b>C18:0</b>	1,67 ± 0,171 a	1,51 ± 0,011 a	1,66 ± 0,101 a	1,66 ± 0,107 a	1,58 ± 0,129 a
<b>C18:1</b>	20,10 ± 0,064 b	20,71 ± 0,020 a	20,10 ± 0,145 b	20,44 ± 0,108 a,b	20,77 ± 0,190 a
<b>C18:2</b>	56,15 ± 0,099 a	56,51 ± 0,254 a	55,82 ± 0,454 a	56,08 ± 0,315 a	55,81 ± 0,325 a
<b>C18:3</b>	4,16 ± 0,024 a	4,22 ± 0,019 a	3,93 ± 0,069 b	4,24 ± 0,045 a	4,11 ± 0,027 a

Quanto à composição qualitativa dos ácidos gordos (Figura 3.72; Tabela 3.53), destacaram-se pela sua abundância, os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3), com percentagens que oscilaram entre 1,51 - 56,51 %.

O ácido palmítico apresentou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, particularmente no caso 16,2 g 0,3 L<sup>-1</sup> face aos tratamentos 8,1 g 0,3 L<sup>-1</sup> e 32,4 g 0,3 L<sup>-1</sup>. Quanto aos ácidos esteárico e linoleico não se verificaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Os valores percentuais de ácido oleico variaram de forma significativa entre os diferentes tratamentos, observando-se um valor máximo de 20,77 % no tratamento 64,8 g 0,3 L<sup>-1</sup>. Em particular para o ácido linolénico verificou-se que não ocorreram variações significativas, à exceção do tratamento 16,2 g 0,3 L<sup>-1</sup>, com um valor de 3,93 %.

Stuper-Szablewska *et al.* (2014), num estudo realizado em ensaio de campo com 30 cultivares de trigo de inverno, indicaram que os teores médios de ácidos gordos corresponderam a 16,9 % referente ao ácido palmítico (C16:0), 2,8 % para o ácido esteárico (C18:0), 11,9 % para o ácido oleico (C18:1), 55,2 % relativamente ao ácido linoleico (C18:2) e cerca de 5,5 % para o ácido linolénico (C18:3). Confrontando com os nossos resultados (Figura 3.72; Tabela 3.53), verificou-se uma sobreposição na faixa apontada por estes autores, com exceção do ácido oleico que apresenta valores substancialmente superiores.



**Figura 3.73** – Percentagem dos ácidos gordos menos representativos (< 1 %) no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

**Tabela 3.54** – Média da percentagem dos ácidos gordos menos representativos (< 1 %), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %) para cada tratamento. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada ácido gordo.

Ácidos Gordos	Ctl	8,1 g 0,3 L <sup>-1</sup>	16,2 g 0,3 L <sup>-1</sup>	32,4 g 0,3 L <sup>-1</sup>	64,8 g 0,3 L <sup>-1</sup>
<b>C8:0</b>	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
<b>C10:0</b>	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
<b>C12:0</b>	0,01 ± 0,002 a,b	0,01 ± 0,001 a,b	0,02 ± 0,004 a	0,01 ± 0,000 a,b	0,00 ± 0,004 b
<b>C13:0</b>	0,02 ± 0,004 a	0,01 ± 0,004 a	0,03 ± 0,006 a	0,02 ± 0,001 a	0,02 ± 0,001 a
<b>C14:0</b>	0,11 ± 0,006 a	0,10 ± 0,007 a	0,11 ± 0,003 a	0,12 ± 0,007 a	0,11 ± 0,005 a
<b>C14:1</b>	0,04 ± 0,006 a	0,04 ± 0,007 a	0,06 ± 0,006 a	0,07 ± 0,008 a	0,04 ± 0,014 a
<b>C15:0</b>	0,12 ± 0,010 a	0,13 ± 0,016 a	0,11 ± 0,004 a	0,13 ± 0,009 a	0,12 ± 0,010 a
<b>C16:1</b>	0,12 ± 0,017 b	0,09 ± 0,002 b	0,17 ± 0,037 a,b	0,24 ± 0,003 a	0,18 ± 0,028 a,b
<b>C20:0</b>	0,67 ± 0,049 a	0,77 ± 0,031 a	0,76 ± 0,099 a	0,82 ± 0,079 a	0,63 ± 0,040 a
<b>C20:1</b>	0,11 ± 0,029 a	0,12 ± 0,028 a	0,08 ± 0,009 a	0,16 ± 0,044 a	0,08 ± 0,010 a
<b>C20:2</b>	0,18 ± 0,052 a	0,17 ± 0,059 a	0,18 ± 0,023 a	0,32 ± 0,077 a	0,16 ± 0,043 a
<b>C22:0</b>	0,06 ± 0,002 a,b	0,08 ± 0,005 a	0,07 ± 0,009 a,b	0,08 ± 0,005 a	0,05 ± 0,006 b

Destacam-se como ácidos gordos menos representativos ( $< 1\%$ ) no grão, (Figura 3.73; Tabela 3.54), os ácidos caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0), tridecanóico (C13:0), mirístico (C14:0), miristoléico (C14:1), pentadecanóico (C15:0), palmitoleico (C16:1), aráquico (C20:0), gadoleico (C20:1), eicosadienoico (C20:2) e behénico (C22:0), com percentagens que oscilaram entre 0,00 - 0,82 %, estando em conformidade com os dados apontados na literatura (Stuper-Szablewska *et al.*, 2014).

Nenhum dos ácidos gordos apresentou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, à exceção dos ácidos láurico (C12:0), palmitoleico (C16:1) e behénico (C22:0), observando-se valores máximos de 0,02 %, 0,24 % e 0,08 %, respetivamente.

### 3.3.1.3 Glícidos

Dos açúcares solúveis analisados, os mais abundantes no grão de trigo duro foram a estaquiase, rafinose e sacarose. A glucose, galactose, frutose e manitol encontraram-se entre os menos abundantes (Figura 3.74; Tabela 3.55).

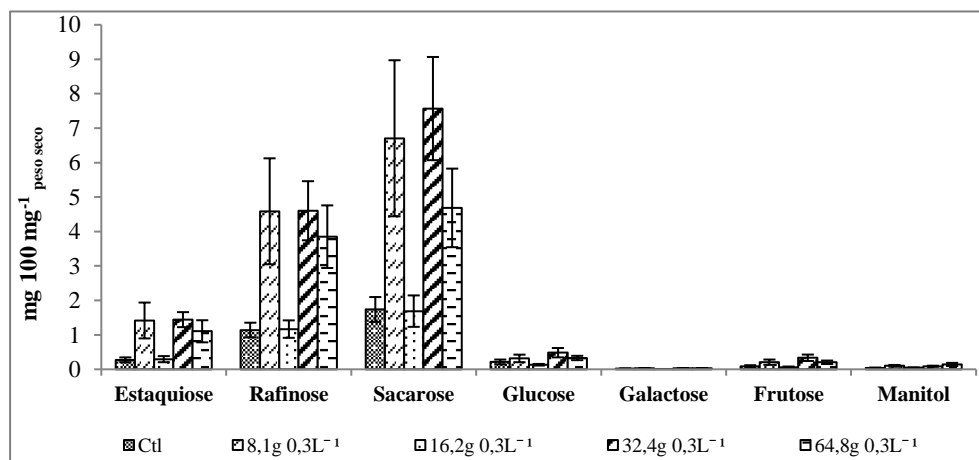


Figura 3.74 – Teor médio de glícidos no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento.

**Tabela 3.55** – Média do teor de glúcidos no grão ( $\text{mg } 100 \text{ mg}^{-1} \text{ peso seco}$ ), respetivo erro padrão e análise de variância ( $\alpha = 0,05 \%$ ) para cada tratamento. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada glúcido.

Glúcidos	Ctl	8,1 g 0,3 L <sup>-1</sup>	16,2 g 0,3 L <sup>-1</sup>	32,4 g 0,3 L <sup>-1</sup>	64,8 g 0,3 L <sup>-1</sup>
<b>Estaquiase</b>	0,27 ± 0,071 b	1,42 ± 0,521 a	0,30 ± 0,089 a,b	1,44 ± 0,218 a	1,10 ± 0,320 a,b
<b>Rafinose</b>	1,14 ± 0,212 a	4,59 ± 1,538 a	1,17 ± 0,253 a	4,60 ± 0,857 a	3,85 ± 0,909 a
<b>Sacarose</b>	1,74 ± 0,361 b	6,71 ± 2,265 a,b	1,69 ± 0,456 b	7,57 ± 1,498 a	4,69 ± 1,140 a,b
<b>Glucose</b>	0,21 ± 0,071 a	0,32 ± 0,110 a	0,13 ± 0,023 a	0,48 ± 0,136 a	0,33 ± 0,063 a
<b>Galactose</b>	0,02 ± 0,012 a	0,03 ± 0,009 a	0,01 ± 0,001 a	0,03 ± 0,005 a	0,03 ± 0,008 a
<b>Frutose</b>	0,09 ± 0,028 b	0,21 ± 0,077 a,b	0,06 ± 0,018 b	0,33 ± 0,094 a	0,20 ± 0,050 a,b
<b>Manitol</b>	0,04 ± 0,007 b	0,10 ± 0,026 a,b	0,05 ± 0,010 a,b	0,09 ± 0,015 a,b	0,14 ± 0,045 a

Relativamente à rafinose, glucose e galactose não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos, ocorrendo um valor máximo (em  $\text{mg } 100 \text{ mg}^{-1} \text{ peso seco}$ ) de 4,60, 0,48 e 0,03, respetivamente (Figura 3.74; Tabela 3.55). Os teores de estaquiase variaram significativamente entre os diferentes tratamentos, obtendo-se um valor máximo no tratamento 32,4 g 0,3 L<sup>-1</sup>. Os níveis de sacarose não variaram de forma significativa, à exceção do tratamento 32,4 g 0,3 L<sup>-1</sup>, prevalecendo neste uma concentração mais elevada de sacarose. Quanto à frutose e ao manitol não se observaram variações significativas, à exceção dos tratamentos 32,4 g 0,3 L<sup>-1</sup> e 64,8 g 0,3 L<sup>-1</sup>, respetivamente, prevalecendo nestes tratamentos concentrações mais elevadas dos respetivos açúcares.

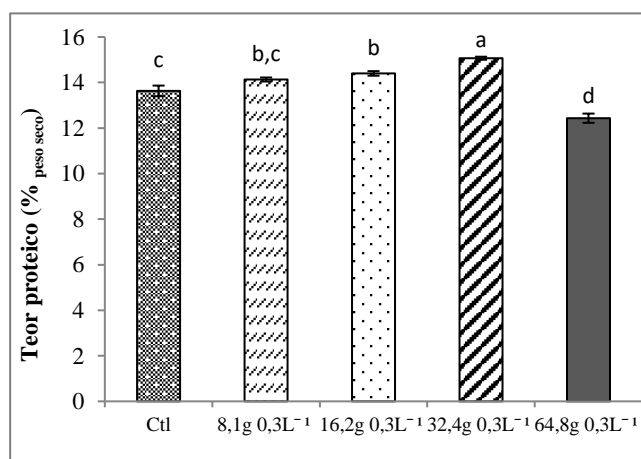
Segundo Gunina e Kuzyakov (2015) os teores de glucose em diferentes matrizes vegetais oscilam entre 0,3 - 0,4  $\text{mg } 100 \text{ mg}^{-1} \text{ peso seco}$ , 0,4 - 0,6  $\text{mg } 100 \text{ mg}^{-1} \text{ peso seco}$  para a galactose e 0,05 - 0,35  $\text{mg } 100 \text{ mg}^{-1} \text{ peso seco}$  para a frutose, enquadrando-se, portanto, com os resultados obtidos neste estudo.

### 3.3.1.4 Proteínas e fração azotada

Quanto ao teor médio de proteínas no grão, observaram-se variações significativas entre os diferentes tratamentos, tendo os mesmos oscilado entre 13,6 - 15,1 %  $\text{peso seco}$ , obtendo-se um valor máximo no tratamento 32,4 g 0,3 L<sup>-1</sup> (Figura 3.75). O teor médio de proteína no trigo duro, que usualmente oscila entre 12 - 16 %  $\text{peso seco}$  (INIAV, 2014), também se verificou no nosso estudo.

Bilsborrow *et al.* (2013), utilizando sementes de trigo duro em ensaios de campo, demonstraram que o teor de proteína de trigo cultivado organicamente é menor comparativamente com trigo cultivado sob um sistema de gestão convencional, *i.e.*, 9,3 % vs 12,5 % *peso seco*, valores semelhantes aos obtidos por Campiglia *et al.* (2015), para trigo duro que se situavam entre 10,4 - 12,6 % *peso seco*, embora salientando que temperaturas elevadas combinadas com *stress* hídrico durante o período de enchimento do grão promovem uma diminuição consistente na produção de grãos e um incremento do teor de proteína e vitreosidade. Os resultados por nós obtidos (Figura 3.75) são substancialmente superiores aos valores descritos por estes autores.

Rao *et al.* (2001) também reportaram num estudo realizado com amostras de trigo duro cultivadas em ensaio de campo que os teores de proteína oscilam entre 11,9 - 12,0 % *peso seco*. Estes autores verificaram que a relação entre a qualidade do trigo duro e a glutenina LMW está integrada num modo complexo de subunidades específicas LMW codificadas nos *locus Glu-A3*, *Glu-B3* e *Glu-B2*. Adicionalmente Morgounov *et al.* (2013) indicaram que o teor de proteína para o trigo duro encontra-se na faixa compreendida entre 15,9 - 17,2 % *peso seco*.



**Figura 3.75** – Teor médio de proteínas no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada tratamento. As letras *a*, *b*, *c*, *d* indicam diferenças significativas entre os tratamentos estudados.

### 3.3.1.5 Características tecnológicas

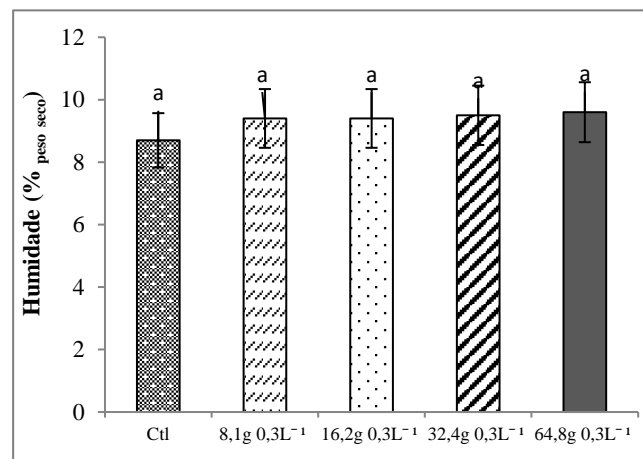
#### 3.3.1.5.1 Humidade

Relativamente ao índice de humidade no grão de trigo duro verificou-se uma quase ausência de variação entre os diferentes tratamentos, tendo os valores oscilado entre 8,7 - 9,6 % *peso seco*, obtendo-se um valor máximo no tratamento 64,8 g 0,3 L<sup>-1</sup> (Figura 3.76). Contudo, o índice de humidade no trigo duro é usualmente inferior a 12 % *peso seco* (INIAV, 2014).



Torbica *et al.* (2011) referem num estudo realizado com amostras de farinha de trigo mole e sêmola de trigo duro que o índice de humidade nas mesmas oscila entre 10,1 - 12,2 % *peso seco*. Neste contexto verificou-se que os resultados obtidos neste estudo (Figura 3.76) são substancialmente inferiores aos valores descritos por estes autores. Jansens *et al.* (2013) efetuaram um estudo com amostras de sêmola de trigo duro com a finalidade de determinar o índice de humidade das mesmas após armazenamento à temperatura ambiente em sacos de plástico selados, verificando que o índice de humidade variou entre 5,9 - 8,1 % *peso seco*. Adicionalmente Jansens *et al.* (2011) observaram teores de humidade em amostras de trigo duro compreendidos entre 5,6 - 9,1 % *peso seco*, tendo demonstrado que o teor de humidade apresenta um forte impacto sobre a formação de rede do glúten.

Dados obtidos por Li *et al.* (2011) revelaram teores de humidade variáveis entre 10,1 - 10,7 % *peso seco* em cinco variedades de trigo de inverno. Paralelamente, Kalkan e Kara (2011) consideraram teores de humidade ligeiramente menores numa faixa compreendida entre 7,9 e 9,5 % *peso seco* para diferentes cultivares de trigo.



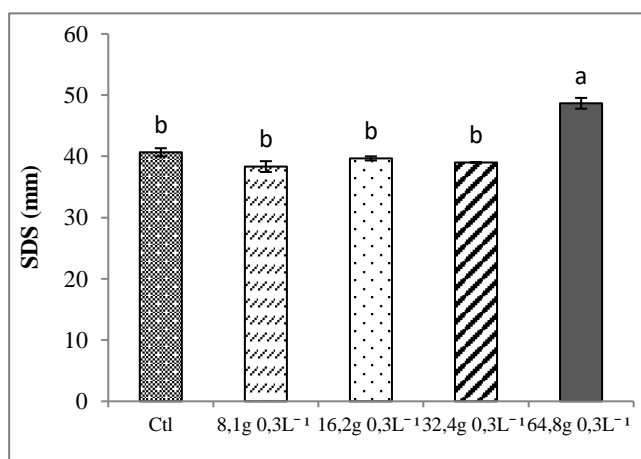
**Figura 3.76** – Teor médio de humidade no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento.

### 3.3.1.5.2 Índice de sedimentação SDS

Relativamente ao volume de sedimentação apenas o tratamento 64,8 g 0,3 L<sup>-1</sup> apresentou variações significativas face aos restantes, prevalecendo neste caso uma concentração mais elevada deste volume (Figura 3.77). O teor médio de SDS no trigo duro deve ser superior a 50 mm (INIAV, 2014). Confrontando os resultados obtidos, estes encontram-se numa faixa substancialmente inferior ao teor considerado. Constatou-se assim que o incremento de nutrientes na solução nutritiva afetou de forma significativa o volume de sedimentação no grão.

De acordo com Campiglia *et al.* (2015) o índice de sedimentação SDS para o trigo duro oscila entre 34 - 44 mm, estando em conformidade com os resultados obtidos no nosso estudo. Zhi-ying *et al.* (2013) referem que o índice de sedimentação se encontra positivamente correlacionado com o teor de proteína, gordura e glúten, mas negativamente correlacionado com o teor de amido. Estes autores indicaram teores compreendidos entre 17 - 53 mm para amostras de trigo duro. Adicionalmente, Katyal *et al.* (2016) sugeriram valores de índice de sedimentação para amostras de farinha de trigo compreendidos entre 27 - 51 mm. O teor de proteína destas amostras apresentou uma relação positiva forte com o índice de sedimentação.

Li *et al.* (2013) também reportaram teores de SDS em diferentes cultivares de trigo duro oscilando entre 10 - 11 mm. As mudanças verificadas ao nível do SDS são influenciadas por alterações no teor de proteína. Mazzoncini *et al.* (2015) consideraram teores de SDS compreendidos entre 33 - 43 mm em cultivares de trigo de inverno. Estes resultados são consistentes com os resultados propostos por Katyal *et al.* (2016).



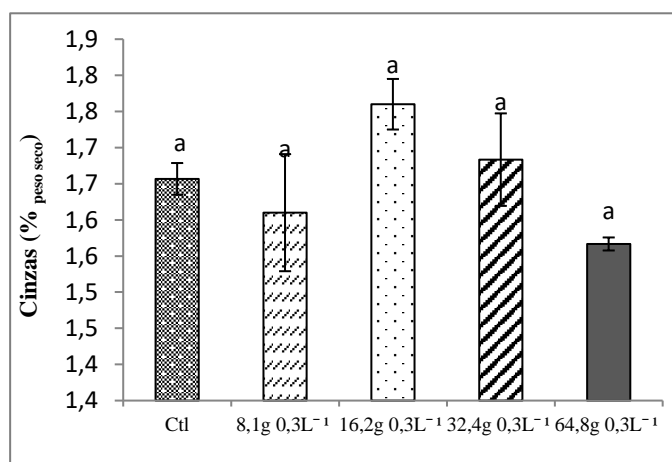
**Figura 3.77** – Volume de sedimentação (SDS) no grão e respetivo erro padrão ( $n = 3$ ), para cada concentração. As letras *a*, *b* indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

### 3.3.1.5.3 Cinzas

Quanto ao teor de cinzas no grão não se verificaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os valores médios dos diferentes tratamentos, ocorrendo um valor máximo de 1,76 %, no tratamento 16,2 g 0,3 L<sup>-1</sup> (Figura 3.78), o que está de acordo com o expresso pelo INIAV (2014) que afirma que o teor de cinzas no trigo duro deve ser inferior a 1,8 %. Constatou-se assim que o incremento de nutrientes na solução nutritiva não afetou de forma significativa o teor médio de cinzas no grão.

Sieber *et al.* (2015) reportaram num estudo realizado com três variedades de trigo duro que o teor de cinzas nas mesmas oscila entre 1,7 - 2,1 %. Neste enquadramento verificou-se que os resultados obtidos no nosso estudo (Figura 3.78) se encontram numa faixa inferior relativamente aos valores descritos por estes autores. Rao *et al.* (2001) também sugeriram num estudo realizado com amostras cultivadas em ensaio de campo que o teor de cinzas oscila entre 0,63 - 0,69 %.

Adicionalmente, Campiglia *et al.* (2015) consideraram teores médios de cinzas na ordem de 1,8 %. Segundo estes autores, diferentes níveis de disponibilidade de azoto mineral podem influenciar o teor de cinzas no grão de trigo.



**Figura 3.78** – Teor médio de cinzas no grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. A letra *a* indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos estudados.

#### 3.3.1.5.4 Vitreosidade

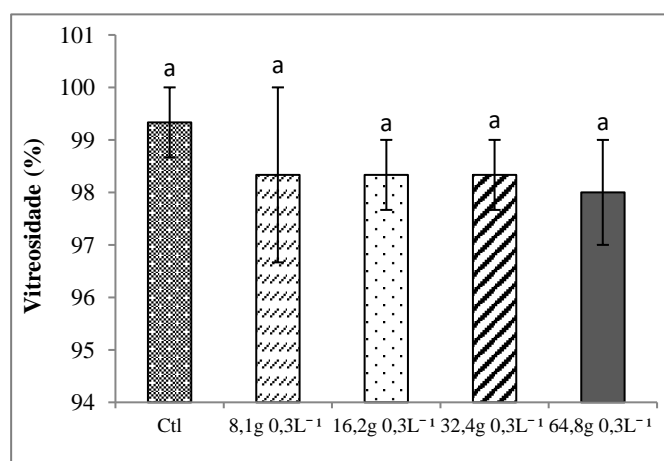
A vitreosidade consiste num parâmetro de importância crucial para o trigo duro pois influencia em grande medida o rendimento de sêmola. Para a determinação inicial do rendimento de sêmola, a vitreosidade é utilizada como uma característica indireta (Sieber *et al.*, 2015).

Nos resultados obtidos neste estudo não se observaram variações significativas entre os diferentes tratamentos, tendo os teores oscilado entre 98,0 - 99,3 %, obtendo-se um valor máximo no tratamento controlo (Figura 3.79). O valor mínimo considerado aceitável para este parâmetro é de 80 % (INIAV, 2014). Constatou-se assim que o incremento de nutrientes na solução nutritiva não afetou de forma significativa a vitreosidade do grão.

A relação entre o teor de proteína e a vitreosidade é amplamente discutida na literatura. Sissons (2004), Pagnotta *et al.* (2005) e Bilgin *et al.* (2010) relataram associações positivas entre estes dois parâmetros. Por oposição, Autran *et al.* (1986), Longin *et al.* (2013) e Pinheiro *et al.* (2013) não observaram qualquer correlação. De acordo com Sieber *et al.* (2015) o teor

de proteína encontra-se fortemente relacionado com a vitreosidade e a produção de grãos de trigo duro, mostrando uma complexa rede de interação. Um incremento do teor de proteína e vitreosidade pode ser obtido a partir de uma maior disponibilidade de azoto mineral.

O estudo realizado por Ferreira *et al.* (2012) utilizou sementes de trigo duro, cultivar Dakter, semeadas em vaso para subsequente crescimento numa câmara de crescimento. Estes autores reportaram a ocorrência de 44 - 100 % de grãos vítreos durante a maturação fisiológica. A percentagem de grãos vítreos foi então altamente correlacionada com a concentração de proteína no grão. Num estudo realizado com amostras de trigo duro cultivadas em ensaio de campo Venora *et al.* (2009) sugeriram que o teor de vitreosidade nas mesmas oscila entre 81,7 - 86,7 %. Adicionalmente, Campiglia *et al.* (2015) indicaram teores de vitreosidade compreendidos entre 84,9 - 92,3 % em grãos de trigo duro. Estes autores propõem assim valores inferiores face aos resultados obtidos contudo, a utilização de diferentes genótipos e de plantas em diferentes fases de crescimento submetidas a diferentes condições ambientais poderão estar na base destas diferenças.



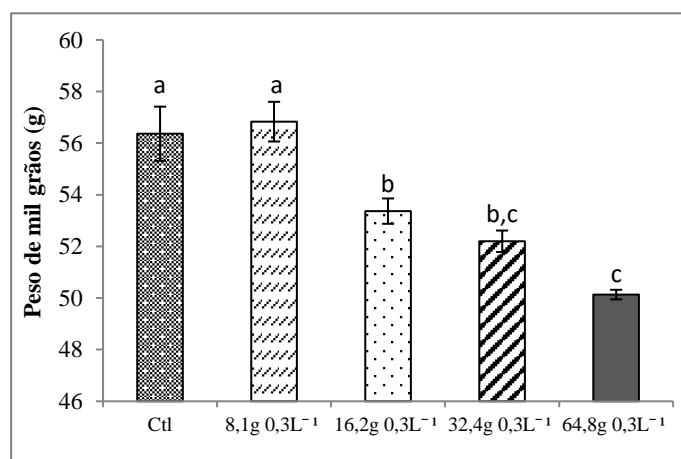
**Figura 3.79** – Vitreosidade do grão e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. A letra *a* indica a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos estudados.

### 3.3.1.5.5 Peso de mil grãos

O peso de mil grãos consiste num teste físico fundamentalmente relacionado com o valor moageiro do trigo, sendo geralmente utilizado tanto na sua comercialização como nas várias etapas do melhoramento (Bagulho, 2008). Este é um dos parâmetros utilizados em ensaios agronómicos para a avaliação de genótipos. Através deste índice é possível caracterizar um genótipo e evidenciar desequilíbrios ocorridos no processo de formação dos grãos, assim como estudar a influência das condições climáticas e das práticas culturais durante o desenvolvimento da cultura (Mandarino, 1993).

Comparando o peso de mil grãos (PMG) entre os diferentes tratamentos é possível observar variações significativas, tendo os teores oscilado entre 50,1 - 56,8 g. Denota-se um decréscimo significativo ao longo dos tratamentos, obtendo-se um valor máximo no tratamento 8,1 g 0,3 L<sup>-1</sup> (Figura 3.80).

Lidon *et al.* (2015) realizaram um estudo com sementes de trigo mole, variedade Roxo, para subsequente crescimento numa câmara de crescimento, em condições ambientais controladas. Estes autores reportaram que o peso de mil grãos se situa entre 39,8 - 48,5 g. Morgounov *et al.* (2013) indicaram que o peso de mil grãos para o trigo duro se situa entre 30,5 - 37,4 g. Adicionalmente, Boggini *et al.* (1995) sugeriram valores compreendidos entre 28,0 - 48,5 g em diferentes cultivares de trigo duro comercial. Também Campiglia *et al.* (2015) relataram teores compreendidos entre 42,6 - 49,8 g em grãos de trigo duro. Os autores indicados propõem assim valores inferiores face aos resultados obtidos contudo, a utilização de diferentes genótipos e de plantas em diferentes fases de crescimento submetidas a diferentes condições ambientais poderão estar na base destas diferenças.



**Figura 3.80** – Peso de mil grãos e respetivo erro padrão (n = 3), para cada tratamento. As letras *a*, *b*, *c* indicam diferenças significativas entre os tratamentos.

### 3.3.1.5.6 Cor

Dos parâmetros colorimétricos analisados, a luminosidade (L\*) das amostras em estudo (Tabela 3.56), apresentou o valor mais elevado nos tratamentos controlo e 64,8 g 0,3 L<sup>-1</sup> (79,12). O menor valor foi observado no tratamento 32,4 g 0,3 L<sup>-1</sup> (78,77). Para as coordenadas a\* e b\* de cromaticidade constataram-se diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Relativamente ao parâmetro a\* o valor mais elevado ocorreu no tratamento 32,4 g 0,3 L<sup>-1</sup> (1,15) e o valor mais baixo foi observado no tratamento 64,8 g 0,3 L<sup>-1</sup> (0,61). Para o parâmetro b\* observou-se o valor mais elevado no tratamento 64,8 g 0,3 L<sup>-1</sup> (15,20) e o valor

mais reduzido no tratamento 8,1 g 0,3 L<sup>-1</sup> (14,78). Constatou-se assim que o incremento de nutrientes na solução nutritiva afetou de forma significativa os parâmetros colorimétricos das amostras estudadas.

A determinação da cor (Tabela 3.56) identifica as amostras referentes ao tratamento 32,4 g 0,3 L<sup>-1</sup> com menor luminosidade, sugerindo que estas são mais escuras que as restantes. E as amostras referentes aos tratamentos controlo e 64,8 g 0,3 L<sup>-1</sup> são tidas como as mais claras. Adicionalmente, verifica-se uma maior contribuição do vermelho (+a\*) em relação ao verde (-a\*) na tonalidade da maioria das amostras, assim como do amarelo (+b\*) em relação ao azul (-b\*). Esta é uma técnica não destrutiva de avaliação do índice de biofortificação entre as diferentes amostras em estudo.

**Tabela 3.56** – Parâmetros colorimétricos das amostras, com a respetiva análise de variância ( $\alpha = 0,05$  %), para cada tratamento. Os valores apresentados correspondem à média dos parâmetros colorimétricos e respetivo erro padrão. As letras *a*, *b*, *c*, *d* indicam diferenças significativas entre os tratamentos para cada parâmetro colorimétrico.

Parâmetro	Ctl	8,1 g 0,3 L <sup>-1</sup>	16,2 g 0,3 L <sup>-1</sup>	32,4 g 0,3 L <sup>-1</sup>	64,8 g 0,3 L <sup>-1</sup>
<b>L*</b>	79,12 ± 0,075 a	78,90 ± 0,093 a,b	78,86 ± 0,049 a,b	78,77 ± 0,031 b	79,12 ± 0,134 a
<b>a*</b>	0,96 ± 0,009 c	1,00 ± 0,020 b,c	1,06 ± 0,006 b	1,15 ± 0,018 a	0,61 ± 0,033 d
<b>b*</b>	14,89 ± 0,094 b,c	14,78 ± 0,035 c	15,02 ± 0,036 a,b,c	15,11 ± 0,082 a,b	15,20 ± 0,097 a



## **IV – Conclusão**

---



## Capítulo IV - Conclusão

A concentração de minerais nos órgãos da planta é influenciada por interações edafoclimáticas com a própria planta, para além de aspetos decorrentes de práticas agrícolas onde se destaca por exemplo a fertilização. Neste sentido, as propriedades físico-químicas do solo são determinantes no crescimento e desenvolvimento das plantas em particular o pH e a matéria orgânica que muito influenciam a disponibilidade dos nutrientes minerais. Acresce, que acontecimentos naturais como inundações, *stress* hídrico ou súbitas ondas de calor podem contribuir decisivamente para a perda acentuada de produtividade.

As plantas foram cultivadas numa câmara de crescimento em condições ambientais controladas e submetidas, a níveis de fertilização progressivamente mais elevados pela solução nutritiva de Hoagland (2, 4 e 6 vezes). As plantas também foram cultivadas em estufa, em Oeiras, recorrendo à aplicação de um sistema de fertilização idêntico e num campo experimental, em Elvas, Herdade da Comenda. Relativamente à implementação da cultura em ambiente controlado pretendeu-se estudar a plasticidade metabólica do trigo duro, que se traduziu na acumulação máxima de elementos minerais sem ocorrência de *stress*. O principal objetivo consistiu em obter a produção máxima em condições ideais. Paralelamente, o ensaio em estufa permitiu um controlo parcial das variáveis de crescimento sem limitações de adubação. Por último, realizou-se ensaio de campo em condições ambientais não controladas. Neste último caso, pretendeu-se avaliar se através da aplicação da adubação foliar, os resultados manteriam uma tendência semelhante à verificada no ambiente controlado. Este ensaio traduz a situação real do agricultor que poderá ser seguida posteriormente. A finalidade dos diferentes tipos de ensaio residiu na obtenção de grão com qualidade para produção de massas alimentícias, sendo certo que as diferenças entre os ensaios nos darão perspetivas diferentes.

Quanto aos diferentes parâmetros fotossintéticos, embora tenham sido detetadas algumas variações, estas não foram apreciáveis, concluindo-se assim que o limiar de toxicidade não foi alcançado nos diferentes tratamentos.

Embora a biofortificação em ferro não tenha sido apreciável devido à reduzida mobilidade deste elemento na planta, constatou-se uma biofortificação substancial em diversos elementos minerais. Nas condições impostas observou-se uma biofortificação limitada em ferro, muito provavelmente devido à ausência de compostos envolvidos na translocação para os órgãos aéreos. Quanto ao cobre não foram reveladas variações significativas nos diferentes tipos de ensaio, enquanto que para o manganês e zinco, verificou-se um incremento significativo em ambiente controlado e estufa, no entanto, no ensaio de campo a tendência entre os diferentes tratamentos foi menor. O cálcio sofreu um incremento significativo em ambiente controlado e estufa, porém no ensaio de campo manteve-se constante. Nos ensaios

considerados, verificou-se para todos os tratamentos, relativamente ao controlo, um acentuado aumento nos teores de potássio. Nas condições impostas, o magnésio e o fósforo não apresentaram variações significativas nos diferentes ensaios.

Os ácidos gordos totais no grão decresceram em estufa e no ensaio de campo e aumentaram em ambiente controlado, denotando um enriquecimento em lípidos nos grãos.

Por oposição, os ácidos gordos insaturados que predominam nos lípidos do grão de trigo são potencialmente sensíveis à oxidação. A deterioração produz compostos voláteis indesejáveis, particularmente hidroperóxidos (cetonas e aldeídos), responsáveis por alterações nutricionais, tais como, escurecimento e rancificação. O processo de oxidação é espontâneo e inevitável, ocorrendo através de diversos mecanismos enzimáticos. Atendendo aos requisitos de armazenamento, estabilidade e preservação das características da sêmola, torna-se desejável utilizar tratamentos com um menor índice de insaturação. Neste contexto poderão ser mais adequados os tratamentos 15 mL e 60 mL em ambiente controlado, 90 mL em estufa e o tratamento 16,2 g 0,3 L<sup>-1</sup> em campo.

Considerando os ácidos gordos saturados, verificou-se que o ácido palmítico (C16:0) foi predominante em todos os ensaios. As variações detectadas para o ácido palmítico resultaram eventualmente de uma maior acumulação no endosperma nos grãos, onde este ácido gordo se localiza. Note-se que os ácidos gordos saturados parecem contribuir para a qualidade panificativa das farinhas.

A nível nutricional, os ácidos linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3) são ácidos gordos essenciais para a saúde humana. Entre os ácidos gordos insaturados dos diferentes ensaios, o ácido linoleico (C18:2) prevaleceu em todos. A ingestão destes ácidos gordos conduz a diversos benefícios para a saúde humana, nomeadamente redução da absorção do colesterol e melhoria do ambiente do aparelho digestivo.

Dos açúcares solúveis analisados, os mais abundantes no grão de trigo duro foram a rafinose e a sacarose em todos os ensaios. Por oposição, a glucose e a galactose, encontraram-se entre os menos representativos. O tratamento 90 mL apresentou os teores mais elevados de manitol em ambiente controlado. Atendendo aos efeitos benéficos do manitol (antioxidante), salienta-se a importância desta característica do ponto de vista nutricional.

No que diz respeito ao teor em proteína, verificou-se uma tendência crescente em todos os ensaios implementados. Os tratamentos com teor proteico mais elevado correspondem ao 90 mL, 60 mL e 32,4 g 0,3 L<sup>-1</sup> em ambiente controlado, estufa e campo, respetivamente. O incremento de nutrientes na solução nutritiva influenciou a força da massa (índice de sedimentação SDS) no tratamento 64,8 g 0,3 L<sup>-1</sup>, apesar do mesmo ter apresentado uma redução na percentagem de proteína. Neste contexto, este tratamento poderá possuir proporções ideais das proteínas de alto potencial (gliadina e glutenina) para fins de panificação.

Em ambiente controlado o teor de cinzas encontra-se acima do limite legal estabelecido, como consequência do incremento dos elementos minerais na solução nutritiva. Esta característica pode propiciar uma cor mais escura, assim como, interferir na formação do glúten. Contrariamente ao expectável, as sêmolas estudadas apresentaram tendência para a cor amarela. A cor dos grãos de trigo é uma característica genética, no entanto pode sofrer influência dos constituintes do grão, de impurezas na moagem e do ambiente de cultivo. Um exemplo disso é o tratamento 90 mL, que apresentou uma cor mais escura (menor valor de  $L^*$ ) no grão e na sêmola em relação aos outros tratamentos, bem como um elevado teor de proteína. De acordo com a literatura, elevado teor de proteína pode propiciar um escurecimento no trigo e seus derivados.

Considerando a interação entre o rendimento do grão e a acumulação de micro e macronutrientes, os tratamentos 30 mL e 90 mL foram os mais favoráveis para a biofortificação, em ambiente controlado e estufa, respetivamente. Quanto à cultura de campo, a maior acumulação de micro e macronutrientes verificou-se nos tratamentos 8,1 g  $0,3\text{ L}^{-1}$  e 32,4 g  $0,3\text{ L}^{-1}$ , o que indica que o melhor processamento de biofortificação deve considerar estes tratamentos. No entanto, como todos os nutrientes (exceto o Cu e em grande medida o Zn) prevalecem no embrião e farelo dos grãos, a produção de massas alimentícias biofortificadas para consumo humano exige especificamente o uso de sêmola integral.

Este estudo também permitiu perspetivar e justificar algumas indicações para ensaios complementares, que se poderão equacionar numa investigação futura. Neste contexto, discriminam-se os seguintes itens:

- (i) Tornam-se necessários estudos para avaliar a bio digestibilidade e bio assimilação dos diferentes elementos minerais na mucosa intestinal do organismo humano.
- (ii) Em estudos posteriores torna-se importante considerar outros parâmetros indicadores da qualidade nutricional, nomeadamente os antioxidantes, o teor e composição da fibra alimentar, podendo constituir um material interessante para o melhoramento.
- (iii) Os ensaios de campo requerem confirmação até uma conclusão consistente devido às alterações climáticas verificadas a nível global.

## **Referências bibliográficas**

---

## Referências bibliográficas

As referências bibliográficas foram apresentadas nos moldes adotados internacionalmente, com base no modelo seguido pelo *Nutrition Journal*, respeitando a área científica em que se inclui a presente dissertação. O acesso às referências bibliográficas foi realizado no período correspondente a 10/2014 - 12/2015.

- Aalami, M., Leelavathi, K., Rao, U.J.S. (2007). Spaghetti making potential of Indian durum wheat varieties in relation to their protein, yellow pigment and enzyme contents. *Food Chemistry*. 100: 1243-1248.
- Aciksoz, S.B., Yazici, A., Ozturk, L., Cakmak, I. (2011). Biofortification of wheat with iron through soil and foliar application of nitrogen and iron fertilizers. *Plant Soil*. 349: 215-225.
- Adams, W.W. III, Demmig-Adams, B., Verhoeven, A.S., Barker, D.H. (1995). "Photoinhibition" during winter stress: Involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22: 261-276.
- Ahmed, A., Anjum, F.M., Randhawa, M.A., Farooq, U., Akhtar, S., Sultan, M.T. (2012). Effect of multiple fortification on the bioavailability of minerals in wheat meal bread. *Journal of Food Science and Technology*. 49: 737-744.
- Ajiboye, B., Cakmak, I., Paterson, D., de Jonge, M., Howard, D., Stacey, S., Torun, A., Aydin, N., McLaughlin, M. (2015). X-ray fluorescence microscopy of zinc localization in wheat grains biofortified through foliar zinc applications at different growth stages under field conditions. *Plant and Soil*. 392(1-2): 357.
- Akhtar, S., Anjum, F.M., Anjum, M.A. (2011). Micronutrient fortification of wheat flour: Recent development and strategies. *Food Research International*. 44: 652-659.
- Akhtar, S., Anjum, F.M., Saleem-Ur-Rehman, Sheikh, M.A. (2009). Effect of mineral fortification on rheological properties of whole wheat flour. *Journal of Development Studies*. 40: 51-65.
- Al-Khatib, K., Paulsen, G.M. (1989). Enhancement of thermal injury to photosynthesis in wheat plants and thylakoids by high light intensity. *Plant Physiology*. 90: 1041-1048.
- Almeida, A.S. (2007). Parâmetros analíticos de seleção do trigo em ambiente mediterrânico – Produção e qualidade. Dissertação para a obtenção do Grau de Doutor em Biologia – Biologia Vegetal. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Alonso, M., Bermejo, A., Salazar, J., Vidal, D. (1997). Serviço nacional del trigo: El trigo. Madrid: Ministério de Agricultura. 125-146.
- Altenbach, S.B., Dupont, F.M., Kothari, K.M., Chan, R. (2003). Temperature, water and fertilizer influence the timing of key events during grain desenvolvimento in a US spring wheat. *Journal of Cereal Science*. 37: 9-20.

- Altenbach, S.B., Kothari, K.M., Lieu, D. (2002). Environmental conditions during wheat grain development alter temporal regulation of major gluten protein genes. *Cereal Chemistry*. 79: 279-285.
- Amorim, M.V.F.S. (2007). Desenvolvimento de um novo processo de limpeza e condicionamento de grãos de trigo. Dissertação de Mestrado. UFC/Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 68 p.
- Andrew, C.S., Hegarty, M.P. (1969). Comparative responses to manganese excess of eight tropical and four temperate pasture legume species. *Australian Journal of Agricultural Research*. 20: 687-696.
- Araus, J.L., Amaro, T., Voltas, J., Nakhoul, H., Nachit, M.M. (1998). Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Field Crops Research*. 55: 209-223.
- Aravind, N., Sissons, M., Fellows, C. (2011). Can variation in durum wheat pasta protein and starch composition affect in vitro starch hydrolysis? *Food Chemistry*. 124: 816-821.
- Armanino, C., Festa, M.R. (1996). Characterization of wheat by four analytical parameters. A chemometric study. *Analytica Chimica Acta*. 331: 43-51.
- ATSDR. (2004). Agency for Toxic Substances & Disease Registry. Public Health Statement, Copper, September.
- Autran, J.C., Abecassis, J., Feillet, P. (1986). Statistical evaluation of different technological and biochemical tests for quality assessment in durum wheats. *Cereal Chemistry*. 63: 390-394.
- Axford, D.W.E., McDermott, E.E., Redman, D.G. (1978). Small scale tests of bread making quality. *Milling Feed and Fertilizer*. 161: 18-20.
- Bagulho, A.S.R. (2008). Efeito das proteínas de reserva e das associadas ao amido e aos lípidos nas propriedades reológicas de farinhas de trigo mole. Dissertação para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Bagulho, F., Maças, B., Coutinho, J. (1994). Conventional wheat breeding, facing realities of modern portuguese agriculture. In: *Acta Horticulture, Plant Breeding for Mankind*. 355: 147-154.
- Barlow, K.K., Buttrose, M.S., Simmonds, D.H., Vesk, M. (1973). The nature of the starch-protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chemistry*. 50: 443-454.
- Becker, R. (2007). *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Third Edition. Edited by Ching Kuang Chow. CRC Press. 303-316.
- Beleggia, R., Platani, C., Spano, G., Monteleone, M., Cattivelli, L. (2009). Metabolic profiling and analysis of volatile composition of durum wheat semolina and pasta. *Journal of Cereal Science*. 49: 301-309.
- Belton, P.S. (1999). On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*. 29: 103-107.

- Bergmann, W. (1988). Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen. Entstehung, visuelle und analytische Diagnose. Fischer Verlag, Jena.
- Bergmann, W. (1992). Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, New York.
- Berry, J., Björkman, O. (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 31: 491-543.
- Bilgin, O., Korkut, K.Z., Baser, I., Daglioglu, O., Oztürk, I., Balkan, A., Kahraman, T. (2010). Variation and heritability for some semolina characteristics and grain yield and their relations in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *World Journal of Agricultural Sciences*. 6: 301-308.
- Bilsborrow, P., Cooper, J., Tétard-Jones, C., Srednicka-Tober, D., Baranski, M., Eyre, M., Schmidt, C., Shotton, P., Volakakis, N., Cakmak, I., Ozturk, L., Leifert, C., Wilcockson, S. (2013). The effect of organic and conventional management on the yield and quality of wheat grown in a long-term field trial. *European Journal of Agronomy*. 51: 71-80.
- Blumenthal, C.S., Barlow, E.W.R., Wrigley, C.W. (1993). Growth environment and wheat quality: the effect of heat *stress* on dough properties and glúten proteins. *Journal of Cereal Science*. 18: 3-21.
- Boggini, G., Tusa, P., Pogna, N.E. (1995). Bread Making Quality of Durum Wheat Genotypes with some Novel Glutenin Subunit Compositions. *Journal of Cereal Science*. 22: 105-113.
- Bohn, L.M.B., Sørensen, Rasmussen, S.K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*. 9: 165-191.
- Bouis, H.E., Welch, R.M. (2010). Biofortification - A Sustainable Agricultural Strategy for Reducing Micronutrient Malnutrition in the Global South. *Crop Science*. 50: 20-32.
- Boyacioglu, M.H., D'Appolonia, B.L. (1994). Characterization and utilization of durum wheat for breadmaking. I. Comparison of chemical, rheological, and baking properties between bread wheat flours and durum wheat flours. *Cereal Chemistry*. 71: 21-28.
- Brites, C. (2000). A qualidade na fileira trigo, farinha e produto transformado. *Investigação Agrária*. 2(2): 74-76.
- Brouns, F.J.P.H., Buul, V.J.V., Shewry, P.R. (2013). Does wheat make us fat and sick? *Journal of Cereal Science*. 58: 209-215.
- Brown, J.C., Jones, W.E. (1975). Heavy metal toxicity in plants. A crisis in embryo. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 6: 421-438.
- Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant Soil*. 302: 1-17.
- Cakmak, I. (2010). Biofortification of cereals with zinc and iron through fertilization strategy. 19<sup>th</sup> World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. Brisbane, Australia.

- Cakmak, I. (2010a). Potassium for better crop production and quality. *Plant Soil*. 335: 1-2.
- Cakmak, I. (2013). Magnesium in crop production, food quality and human health. *Plant Soil*. 368: 1-4.
- Cakmak, I., Gulut, K.Y., Marschner, H., Graham, R.D. (1994). Effect of zinc and iron deficiency on phytosiderophore release in wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Journal of Plant Nutrition*. 17: 1-17.
- Cakmak, I., Hoffland, E. (2012). Zinc for the improvement of crop production and human health. *Plant Soil*. 361: 1-2.
- Cakmak, I., Kalayci, M., Kaya, Y., Torun, A.A., Aydin, N., Wang, Y., Arisoy, Z., Erdem, H., Yazici, A., Gokmen, O., Ozturk, L., Horst, W.J. (2010b). Biofortification and localization of zinc in wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 9092-9102.
- Cakmak, I., Pfeiffer, W.H., McClafferty, B. (2010c). Biofortification of durum wheat with zinc and iron. *Cereal Chemistry*. 87(1): 10-20.
- Cakmak, I., Torun, A., Millet, E., Feldman, M., Fahima, T., Korol, A., Nevo, E., Braun, H.J., Ozkan, H. (2004). *Triticum dicoccoides*: An important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. *Soil Science and Plant Nutrition*. 50(7): 1047-1054.
- Campiglia, E., Mancinelli, R., De Stefanis, E., Pucciarmati, S., Radicetti, E. (2015). The long-term effects of conventional and organic cropping systems, tillage managements and weather conditions on yield and grain quality of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) in the Mediterranean environment of Central Italy. *Field Crops Research*. 176: 34-44.
- Carrillo, J.M., Vázquez, J.F., Rodríguez-Quijano, M., Ruiz, M. (2006). Mejora de la calidad del trigo. In: Mejora Genetica de la calidad en plantas. Llacer, G., Diez, M.J., Carrillo, J.M., Badenes, M.L. (Eds). Soc. Esp. Ciencias Hortícolas. Soc. Esp. Genetica. Universidad Politecnica de Valencia. Cap. 6.
- Carvalho, S.M.P., Vasconcelos, M.W. (2013). Producing more with less: Strategies and novel technologies for plant-based food biofortification. *Food Research International*. 54: 961-971.
- Carver, B. (1993). Selection for kernel hardness in bread wheat populations: Implications for quality. *Agronomy Abstracts*. 84.
- Castelo, P., Potus, J., Baret, J.L., Nicolas, J. (1998). La maturation des farines: aspects biochimiques et technologiques. Industries des Céréales, Paris: Association pour le progrès des industries des cereals. 108: 5-13.
- Chaney, R.L., Brown, J.C., Tiffin, L.O. (1972). Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiology*. 50.
- Choi, S.H., Kim, J.S., Lee, J.Y., Jeon, J.S., Kim, J.W., Russo, R.E., Gonzalez, J., Yoo, J.H., Kim, K.S., Yang, J.S., Park, K.S. (2014). Analysis of arsenic in rice grains using icp-ms and fs la-icp-ms. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 29(7): 1233.



- Chung, O.K. (1986). Lipid-protein interactions in wheat flour, dough, gluten, and protein fractions. *Cereal foods world*. 242-255.
- Clarke, B.C., Larroque, O.R., Bekes, F., Somers, D., Appels, R. (2001). The frequent classes of expressed genes in wheat endosperm tissue as possible sources of genetic markers. *Australian Journal of Agricultural Research*. 52 (11): 1181-1193.
- Corbellini, M., Canevar, M.G., Mazza, L., Ciaffi, M., Lafiandra, D., Borghi, B. (1997). Effect of the duration and intensity of heat shock during grain filling on dry matter and protein accumulation, technological quality and protein composition in bread and durum wheat. *Australian Journal of Plant Physiology*. 24 (2): 245-260.
- Crawford, R.D. (1995). Proposed role for a combination of citric acid and ascorbic acid in the production of dietary iron overload: a fundamental cause of disease. *Biochemical and Molecular Medicine*. 54: 1-11.
- Cubadda, F., Aureli, F., Raggi, A., Carcea, M. (2009). Effect of milling, pasta making and cooking on minerals in durum wheat. *Journal of Cereal Science*. 49: 92-97.
- Cui, S., Xu, S., Huang, W., Bai, X., Huang, Y., Li, G. (2015). Changing urban phosphorus metabolism: Evidence from Longyan City, China. *Science of the Total Environment*. 536: 924-932.
- Davis, K.R., Peters, L.J., Cain, R.F., Letorneau, D., McGinnis, J. (1984). Evaluation of the nutrient composition of wheat. III. Minerals. *Cereal Food World*. 29: 246-248.
- DellaValle, D.M., Thavarajah, D., Thavarajah, P., Vandenberg, A., Glahn, R.P. (2013). Lentil (*Lens culinaris* L.) as a candidate crop for iron biofortification: Is there genetic potential for iron bioavailability? *Field Crops Research*. 144: 119-125.
- Demmig-Adams, B. (1990). Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1020: 1-24.
- Dengate, H.N. (1984). Swelling, pasting, and gelling of wheat starch. In: Pomeranz, Y. (Ed.), *Advances in Cereal Science and Technology*. American Association of Cereal Chemists, USA, 49-82.
- Dias, A.S., Bagulho, A.S., Lidon, F.C. (2008). Ultrastructure and biochemical traits of bread and durum wheat grains under heat stress. *Brazilian Society of Plant Physiology*. 20(4): 323-333.
- Dias, A.S., Lidon, F.C., Ramalho, J.C. (2009). IV. Heat Stress in *Triticum*: Kinetics of Fe and Mn accumulation. *Brazilian Society of Plant Physiology*. 21(2): 153-164.
- Dias, A.S., Semedo, J., Ramalho, J.C., Lidon, F.C. (2010). Bread and Durum Wheat under Heat Stress: A Comparative Study on the Photosynthetic Performance. *Journal of Agronomy and Crop Science*. #: 1-7.
- Dick, J.W., Quick, J.S. (1983). A modified screening test for rapid estimation of gluten strength in early-generation durum wheat breeding lines. *Cereal Chemistry*. 60: 315- 318.

- Dunford, N.T. (2005). Germ Oils from Different Sources. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Oklahoma State University. 6 (8): 195-231.
- Dupont, F.M., Altenbach, S.B. (2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science*. 38: 133-146.
- Ebens, R., Shacklette, H.T. (1982). Geochemistry of some rocks, mine spoils, stream sediments, soils, plants, and waters in the Western Energy Region of the conterminous United States, U.S. Geol. Surv. Prof. Pap., 1237.
- Edwards, D.G., Asher, C.J. (1982). Tolerance of crop and pasture species to manganese toxicity. In *Proceedings of the Ninth Plant Nutrition Colloquium, Warwick, England* (A. Scaife, ed.), pp. 145-150. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Bucks, U.K.
- Edwards, N.M., Gianibelli, M.C., McCaig, T.N., Clarke, J.M., Ames, N.P., Larroque, O.R., Dexter, J.E. (2007). Relationships between dough strength, polymeric protein quantity and composition for diverse durum wheat genotypes. *Journal of Cereal Science*. 45: 140-149.
- Ehret, M. (1985). Verteilung von phytinsäure, zink und anderen mineralstoffen in weizenkornern unter morphologischen, technologischen und ernährungsphysiologischen aspekten. PhD thesis. Hohenheim University, Stuttgart.
- El-Dash, Ahmed, A., Camargo, C.O., Diaz, N.M. (1982). Composição química do grão de trigo e da farinha. In: *Fundamentos da tecnologia de panificação*. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1, 349 p.
- Elias, E.M. (1995). Durum wheat products. *Options Mediterraneennes* n° 22: 23-31.
- Elsokkary, I.H., Lag, J. (1980). Status of some trace elements in Egyptian soils and in wheat grains. *Jordundersokelsens Saertrykk*. 285, 35.
- EN 15585: 2008. Cereals and cereal products. Durum wheat (*T. durum* Desf.). Determination of percentage of vitreous grains and calculation of percentage of vitreous grains.
- Enko, D., Wagner, H., Kriegshäuser, G., Kimbacher, C., Stolba, R., Halwachs-Baumann, G. (2015). Assessment of human iron status: A cross-sectional study comparing the clinical utility of different laboratory biomarkers and definitions of iron deficiency in daily practice. *Clinical Biochemistry*. 48: 891-896.
- Erenoglu, E.B., Kutman, U.B., Ceylan, Y., Yildiz, B., Cakmak, I. (2011). Improved nitrogen nutrition enhances root uptake, root-to-shoot translocation and remobilization of Zinc in wheat. *New Phytologist*. 189: 438-448.
- Eurostat. (2015). Wheat production and wheat area, disponível online em: <http://ec.europa.eu/eurostat>. Consulta efetuada em 27 de julho de 2015.
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2009). High level expert forum - How to feed the world in 2050. Disponível online em: <http://www.fao.org/wsfs/forum2050/wsfs-forum/en/>. Consulta efetuada em 13 de julho de 2015.

- Farcas, A.C., Socaci, S.A., Dulf, F.V., Tofana, M., Mudura, E., Diaconeasa, Z. (2015). Volatile profile, fatty acids composition and total phenolics content of brewers' spent grain by-product with potential use in the development of new functional foods. *Journal of Cereal Science*. 64: 34-42.
- Farrington, F.F., Warwick, M.J., Shearer, G. (1981). Changes in the carotenoids and sterol fractions during the prolonged storage of wheat flour. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 32 (9): 948-950.
- Feillet, P., Autran, Jean-Claude, Icard-Vernière, C. (2000). Pasta Brownness: An Assessment. *Journal of Cereal Science*. 32: 215-233.
- Ferreira, M.S.L., Martre, P., Mangavel, C., Girousse, C., Rosa, N.N., Samson, M., Morel, M. (2012). Physicochemical control of durum wheat grain filling and glutenin polymer assembly under different temperature regimes. *Journal of Cereal Science*. 56: 58-66.
- Ficco, D.B.M., Riefolo, C., Nicastro, G., De Simone, V., Di Gesù, A.M., Beleggia, R., Platani, C., Cattivelli, L., De Vita, P. (2009). Phytate and mineral elements concentration in a collection of Italian durum wheat cultivars. *Field Crops Research*. 111: 235-242.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Physiology*. 29, 511.
- Galhano, C., Rocha, F., Gomes, C. (1999). Geostatistical analysis of the influence of textural, mineralogical and geochemical parameters on the geotechnical behaviour of the “Argilas de Aveiro” Formation (Portugal). *Clay Minerals*. 34: 109-116.
- Gao, X., Lukow, O.M., Grant, C.A. (2012). Grain concentrations of protein, iron and zinc and bread making quality in spring wheat as affected by seeding date and nitrogen fertilizer management. *Journal of Geochemical Exploration*. 121: 36-44.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 990: 87-92.
- Giannetti, V., Mariani, M.B., Mannino, P., Testani, E. (2014). Furosine and flavour compounds in durum wheat pasta produced under different manufacturing conditions: Multivariate chemometric characterization. *Food Science and Technology*. 56: 15-20.
- Glińska, S., Gapińska, M., Michlewska, S., Skiba, E., Kubicki, J. (2016). Analysis of *Triticum aestivum* seedling response to the excess of zinc. *Protoplasma*. 253 (2): 367-377.
- Glinski, J., Baran, S. (1974). Content of trace elements in winter wheat at different stages of development correlated with NPKCa fertilization and irrigation of soil, *Ann. UMCS*, 129.
- Glinski, J., Melke, J., Uziak, S. (1968). Trace elements content in silt soils of the Polish Carpathian foot-land region. *Rocz. Glebozn.* 19d, 73.
- Gomez-Coronado, F., Poblaciones, M.J., Almeida, A.S., Cakmak, I. (2015). Interactive Effect of Nitrogen Fertilization and Foliar Zn Biofortification on a Bread Wheat Breeding Program under Mediterranean Conditions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. #: 1-24.

- Gough, L.P., Shacklette, H.T., Case, A.A. (1979). Element concentrations toxic to plants, animals, and man. *U.S. Geological Survey Bulletin*. 1466, 80.
- Gouiaa, S., Khoudi, H. (2015). Co-expression of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase with an IRES-mediated dicistronic vector improves salinity tolerance and enhances potassium biofortification of tomato. *Phytochemistry*. 117: 537-546.
- Gounaris, K., Brian, A.P.R., Quinn, P.J., Williams, P. (1984). Structural re-organization of chloroplast thylakoid membranes in response to heat-stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 766: 198-208.
- Graham, R.D., Welch, R.M., Saunders, D.A., Ortiz-Monasterio, I., Bouis, H.E., Bonierbale, M., de Haan, S., Burgos, G., Thiele, G., Liria, R., Meisner, C.A., Beebe, S.E., Potts, M.J., Kadian, M., Hobbs, P.R., Gupta, R.K., Twomlow, S. (2007). Nutritious subsistence food systems. *Advances in Agronomy*. 92: 1-74.
- Gransee, A., Fuhrs, H. (2013). Magnesium mobility in soils as a challenge for soil and plant analysis, magnesium fertilization and root uptake under adverse growth conditions. *Plant Soil*. 368: 5-21.
- Gunina, A., Kuzyakov, Y. (2015). Sugars in soil and sweets for microorganisms: Review of origin, content, composition and fate. *Soil Biology & Biochemistry*. 90: 87-100.
- Guo, W., Zhang, J., Li, W., Xu, M., Liu, S. (2015). Disruption of iron homeostasis and resultant health effects upon exposure to various environmental pollutants: A critical review. *Journal of Environmental Sciences*. 34: 155-164.
- Gutkoski, L.C., Nodari, M.L., Jacobsen Neto, R. (2003). Avaliação de farinhas de trigos cultivados no Rio Grande do Sul na produção de biscoitos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 23: 91-97.
- Haidar, J. (2010). Prevalence of Anaemia, Deficiencies of iron and folic acid and their determinants in Ethiopian women. *Journal of Health Population and Nutrition*. 28: 359-368.
- Hannam, R.J., Ohki, K. (1988). Detection of manganese deficiency and toxicity in plants. In *Manganese in Soils and Plants* (R.D. Graham, R.J. Hannam, N.C. Uren, eds.), pp. 243-259. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Heenan, D.P., Campbell, L.C. (1980). Transport and distribution of manganese in two cultivars of soybean. *Australian Journal of Agricultural Research*. 31, 943.
- Heneen, W.K., Brismar, K. (1987). Scanning electron microscopy of mature grains of rye, wheat and triticale with emphasis on grain shrivelling. *Hereditas*. 107(2): 147.
- Hidalgo, A., Brandolini, A. (2011). Evaluation of heat damage, sugars, amylases and colour in breads from einkorn, durum and bread wheat flours. *Journal of Cereal Science*. 54: 90-97.
- Hodenberg, A., Finck, A. (1975). Ermittlung von Toxizitäts-Grenzwerten für Zink, Kupfer und Blei in Hafer und Rotklee. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 138: 489-503.

- Horst, W.J. (1988). The physiology of manganese toxicity. In *Manganese in Soils and Plants* (R.D. Graham, R.J. Hannam, N.C. Uren, eds.), pp. 175-188. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Hoseney, C. (1994). Principles of Cereal Science and Technology, Second Edition. Editado por Hoseney, C. American Association of Cereal Chemists, USA. In: Leon, A.E., Rosell, C. (2007). *De Tales Harinas, Tales Panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica*. 1ª ed. Córdoba: Hugo Báez Editor.
- Huang, W., Zhang, S.B., Cao, K.F. (2011). Cyclic Electron Flow Plays an Important Role in Photoprotection of Tropical Trees Illuminated at Temporal Chilling Temperature. *Plant and Cell Physiology*. 52(2): 297-305.
- Hussain, S., Maqsood, M.A., Rahmatullah. (2010). Increasing grain zinc and yield of wheat for the developing world: A Review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 22(5): 326-339.
- Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV). (2014). Manual de Boas Práticas em Ambiente Mediterrânico: trigo mole e trigo duro. Programa Nacional de Melhoramento de Cereais Autogâmicos.
- IPMA, Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2015a). “Boletim Climatológico Mensal”, disponível online em: [http://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140108/GhytzQQSdOhITCIftrRo/cli\\_20131201\\_20131231\\_pcl\\_mm\\_co\\_pt.pdf](http://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140108/GhytzQQSdOhITCIftrRo/cli_20131201_20131231_pcl_mm_co_pt.pdf). Consulta efetuada em 24 de março de 2015.
- IPMA, Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2015b). “Boletim Climatológico Mensal”, disponível online em: [http://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140207/SZWB IUwhCXZajwXIhWak/cli\\_20140101\\_20140131\\_pcl\\_mm\\_co\\_pt.pdf](http://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140207/SZWB IUwhCXZajwXIhWak/cli_20140101_20140131_pcl_mm_co_pt.pdf). Consulta efetuada em 24 de março de 2015.
- IPMA, Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2015c). “Boletim Climatológico Mensal”, disponível online em: [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140519/DGnxcSgJdGsAlzOgbebm/cli\\_20140201\\_20140228\\_pcl\\_mm\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140519/DGnxcSgJdGsAlzOgbebm/cli_20140201_20140228_pcl_mm_co_pt.pdf). Consulta efetuada em 24 de março de 2015.
- IPMA, Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2015d). “Boletim Climatológico Mensal”, disponível online em: [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140404/okAMfFlyifZKbBfNLwJZ/cli\\_20140301\\_20140331\\_pcl\\_mm\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140404/okAMfFlyifZKbBfNLwJZ/cli_20140301_20140331_pcl_mm_co_pt.pdf). Consulta efetuada em 24 de março de 2015.
- IPMA, Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2015e). “Boletim Climatológico Mensal”, disponível online em: [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140519/ENaOuUppIDDkykAVZZWa/cli\\_20140401\\_20140430\\_pcl\\_mm\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140519/ENaOuUppIDDkykAVZZWa/cli_20140401_20140430_pcl_mm_co_pt.pdf). Consulta efetuada em 24 de março de 2015.

- IPMA, Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2015f). “Boletim Climatológico Mensal”, disponível online em: [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140609/vQDIPhsMNraOtbmPbtWc/cli\\_20140501\\_20140531\\_pcl\\_mm\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20140609/vQDIPhsMNraOtbmPbtWc/cli_20140501_20140531_pcl_mm_co_pt.pdf). Consulta efetuada em 24 de março de 2015.
- ISO 20483:2013. Cereals and pulses. Determination of the nitrogen content and calculation of the crude protein content Kjeldahl method. International Standardization Organization, 13p.
- Iwasaki, K., Sakurai, K., Takahashi, E. (1990). Copper binding by the root cell walls of Italian ryegrass and red clover. *Soil Science and Plant Nutrition* (Tokyo). 36: 431-440.
- Jansens, K.J.A., Lagrain, B., Rombouts, I., Brijs, K., Smet, M., Delcour, J.A. (2011). Effect of temperature, time and wheat gluten moisture content on wheat gluten network formation during thermomolding. *Journal of Cereal Science*. 54: 434-441.
- Jansens, K.J.A., Vo Hong, N., Telen, L., Brijs, K., Lagrain, B., Vuure, A.W.V., Acker, K.V., Verpoest, I., Puyvelde, P.V., Goderis, B., Smet, M., Delcour, J.A. (2013). Effect of molding conditions and moisture content on the mechanical properties of compression molded glassy, wheat gluten bioplastics. *Industrial Crops and Products*. 44: 480-487.
- Johnston, W.R., Proctor, J. (1977). Metal concentrations in plants and soils from two British serpentine sites. *Plant Soil*. 46, 275.
- Jones Jr., J.B. (2001). Laboratory guide for Conducting soil tests and plant analysis Plant tissue analysis for micronutrients. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. 362pp.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (1992). Trace elements in Soils and Plants, 2<sup>nd</sup> ed., Boca Raton: CRC Press.
- Kabir, A.H., Swaraz, A.M., Stangoulis, J. (2014). Zinc-deficiency resistance and biofortification in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 177(3): 311.
- Kalkan, F., Kara, M. (2011). Handling, frictional and technological properties of wheat as affected by moisture content and cultivar. *Powder Technology*. 213: 116-122.
- Katyal, M., Viridi, A.S., Kaur, A., Singh, N., Kaur, S., Ahlawat, A.K., Singh, A.M. (2016). Diversity in quality traits amongst Indian wheat varieties I: Flour and protein characteristics. *Food Chemistry*. 194: 337-344.
- Khan, I., Yousif, A., Johnson, S.K., Gamlath, S. (2013). Effect of sorghum flour addition on resistant starch content, phenolic profile and antioxidant capacity of durum wheat pasta. *Food Research International*. 54: 578-586.
- Khoshgoftarmanesh, A.H., Roohani, N., Dara, A., Kadivar, M., Schulin, R. (2010). Some nutritional quality and sensory attributes of wheat flours fortified with iron and zinc. *Journal of Food Processing and Preservation*. 34: 289-301.

- Khoshgoftarmanesh, A.H., Sharifi, H.R., Afiuni, D., Schulin, R. (2012). Classification of wheat genotypes by yield and densities of grain zinc and iron using cluster analysis. *Journal of Geochemical Exploration*. 121: 49-54.
- Kilic, H., Erdemci, I., Karahan, T., Aktas, H., Karahan, H., Kendal, E. (2005). Determination of adaptation capability of some durum wheat cultivars in the southeastern Anatolian conditions. GAP IV, Agricultural Congress, Sep 21-23, Sanliurfa, Turkey. 768-773.
- Klughammer, C., Schreiber, U. (2008). Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes* 1: 27-35.
- Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G.E. (2004). New flux parameters for the determination of  $Q_A$  redox state and excitation fluxes. *Photosynthesis Research*. 79: 209-218.
- Krause, G.H., Jahns, P. (2004). Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. In: Papageorgiou GC, Govindjee, eds. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. The Netherlands: Springer. pp. 463-495.
- Krause, G.H., Weis, E. (1984). Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research*. 5: 139-157.
- Krause, G.H., Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 313-349.
- Krupa, Z., Öquist, G., Huner, N.P. (1993). The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* - a fluorescence analysis. *Physiologia Plantarum*. 88: 626-630.
- Kurdziel, M., Dlubacz, A., Weselucha-Birczynska, A., Filek, M., Labanowska, M. (2015). Stable radicals and biochemical compounds in embryos and endosperm of wheat grains differentiating sensitive and tolerant genotypes – EPR and Raman studies. *Journal of Plant Physiology*. 183: 95-107.
- Kutman, U.B., Yildiz, B., Ozturk, L., Cakrnak, I. (2010). Biofortification of durum wheat with zinc through soil and foliar applications of nitrogen. *Cereal Chemistry*. 87: 1-9.
- Lafiandra, D., Kasarda, D.D. (1985). One and two-dimensional (two-pH) polyacrylamide gel electrophoresis in a single gel: separation of wheat proteins. *Cereal Chemistry*. 62: 314-319.
- Lag, J., Steinnes, E. (1978). Contents of some trace elements in barley and wheat grown in Norway, Meld. Nor. Landbrukshoegsk. 57.
- Lang, C.E., Lanning, S.P., Carlson, G.R., Kushnak, G.D., Bruckner, P.L., Talbert, L.E. (1998). Relationship between baking quality and noodle quality in hard white spring wheat. *Crop Science*. 38: 823-827.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S. (2000). The cradle of agriculture. *Science*. 288: 1602-1603.

- Li, X., Cao, Z., Wei, Z., Feng, Q., Wang, J. (2011). Equilibrium moisture content and sorption isosteric heats of five wheat varieties in China. *Journal of Stored Products Research*. 47: 39-47.
- Li, Y., Wu, Y., Hernandez-Espinosa, N., Peña, R.J. (2013). Heat and drought stress on durum wheat: Responses of genotypes, yield, and quality parameters. *Journal of Cereal Science*. 57: 398-404.
- Lichtenthaler, H.K. (1988). In vivo chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants. In: Lichtenthaler, H.K. (ed.), *Applications of chlorophyll fluorescence*. Kluwer Academic Press: Dordrecht, The Netherlands. pp. 129-142.
- Lidon, F.C., Almeida, A.S., Costa, A.R., Bagulho, A.S., Scotti-Campos, P., Semedo, J.N., Maçãs, B., Coutinho, J., Pinheiro, N., Gomes, C., Leitão, A.E., Pais, I.P., Silva, M.M., Reboredo, F.H., Pessoa, M.F., Ramalho, J.C. (2015). Sequential zinc and iron biofortification of bread-wheat grains: from controlled to uncontrolled environments. *Crop & Pasture Science*. 66: #-#.
- Lidon, F.C., Ramalho, J.C., Henriques, F.S. (1993). Copper Inhibition of Rice Photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*. 142: 12-17.
- Lombi, E., de Jonge, M.D., Donner, E., Ryan, C.G., Paterson, D. (2011). Trends in hard x-ray fluorescence mapping: environmental applications in the age of fast detectors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 400(6): 1637.
- Lombi, E., Smith, E., Hansen, T.H., Paterson, D., de Jonge, M.D., Howard, D.L., Persson, D.P., Husted, S., Ryan, C., Schjoerring, J.K. (2011a). Megapixel imaging of (micro) nutrients in mature barley grains. *Journal of Experimental Botany*. 62(1): 273.
- Loneragan, J.F. (1975). The availability and absorption of trace elements in soil-plant systems and their relation to movement and concentration of trace elements in plants. In *Trace Elements in Soil-Plant-Animal Systems* (D.J.D. Nicholas, A.R. Egan, eds.). Academic Press, New York, 109.
- Loneragan, J.F. (1981). Distribution and movement of copper in plants. In *Copper in Soils and Plants* (J.F. Loneragan, A.D. Robson, R.D. Graham, eds.). Academic Press, New York, 165.
- Longin, C.F.H., Sieber, A., Reif, J.C. (2013). Combining frost tolerance, high grain yield and good pasta quality in durum wheat. *Plant Breeding*. 132: 353-358.
- López Bellido, L. (1991). Cultivos herbáceos Vol.I. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid: 26-236.
- Lorenz, K., Reuter, F.W., Sizer, C. (1974). The mineral composition of triticales and triticale milling fractions by X-ray fluorescence and atomic absorption. *Cereal Chemistry*. 51, 534.
- Luo, C., Branlard, G., Griffin, W.B., McNeil, D.L. (2000). The effect of nitrogen and sulphur fertilization on their interaction with genotype on wheat glutenins and quality parameters. *Journal of Cereal Science*. 31: 185-194.
- Maache-Rezzoug, Z., Allaf, K. (2005). Study of the effect of hydrothermal process conditions on pasta quality. *Journal of Cereal Science*. 41: 267-275.



- Mandarino, J.M.G. (1993). Aspetos importantes para a qualidade do trigo. Londrina: Embrapa-CNPO, 60, 32 p.
- Manzano, J.R. (2007). Prolaminas y marcadores moleculares relacionadas con la calidad en Trigo Duro (*Triticum turgidum* L.). Tesis Doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.
- Mares, D.J., Campbell, A.W. (2001). Mapping components of flour and noodle colour in Australian wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*. 52(12): 1297-1309.
- Marjanen, H. (1980). On the relationship between the contents of trace elements in soils and plants and the cancer incidence in Finland. In *Geochemical Aspects in Present and Future Research*, Lag, Ed. Universitetsforlaget, Oslo, 149.
- Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of higher plants, 2<sup>nd</sup> ed., pp 313-364, Academic Press London, UK.
- Marti, J., Slafer, G.A. (2014). Bread and durum wheat yields under a wide range of environmental conditions. *Field Crops Research*. 156: 258-271.
- Martínez-Navarrete, N., Camacho, M.M., Martínez-Lahuerta, J., Martínez-Monzó, J., Fito, P. (2002). Iron deficiency and iron fortified foods - a review. *Food Research International*. 35: 225-231.
- Matsuo, R.R., Dexter, J.E., Boudreau, A., Daun, J.K. (1986). The role of lipids in determining spaghetti cooking quality. *Cereal Chemistry*. 63: 484-489.
- Matz, S. (1999). Bakery Technology and Engineering, 3<sup>o</sup> Edition. Editado por Matz, S. Pan – Tech International, USA. In: Leon, A.E., Rosell, C. (2007). *De Tales Harinas, Tales Panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica*. 1<sup>a</sup> ed. Córdoba: Hugo Báez Editor.
- Mazliak, P. (1983) - Plant membrane lipids: changes and alterations during aging and senescence. In: L. Morris (ed.), *Post-harvest Physiology and Crop Preservation*. Nato Advanced Study Institutes Series, Plenum Press, New York, 123-140.
- Mazzoncini, M., Antichi, D., Silvestri, N., Ciantelli, G., Sgherri, C. (2015). Organically vs conventionally grown winter wheat: Effects on grain yield, technological quality, and on phenolic composition and antioxidant properties of bran and refined flour. *Food Chemistry*. 175: 445-451.
- Medlicoh, A.P., Thompson, A.K. (1985). Analysis of Sugars and organic acids in Ripening of mango fruits (*Mangifera indica* L. var Keitt) by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 36: 561-566.
- Mengel, K., Kirkby, E.A. (1978). *Principles of Plant Nutrition*, International Potash. Institute, Worblaufen, Bern. 593.
- Metcalfe, L.D., Schemitz, A.A., Pelka, J.R. (1966). Rapid preparation of fatty-acids esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*. 38: 514-515.

- Meziani, S., Nadaud, I., Gaillard-Martinie, B., Chambon, C., Benali, M., Branlard, G. (2012). Proteomic analysis of the mature kernel aleurone layer in common and durum wheat. *Journal of Cereal Science*. 55: 323-330.
- Migliori, M., Gabriele, D., de Cindio, B., Pollini, C.M. (2005). Modelling of high quality pasta drying: quality indices and industrial application. *Journal of Food Engineering*. 71: 242-251.
- Miranda, M.Z., Mori, C., Lorini, I. (2005). *Qualidade do trigo brasileiro – safra 2004*. Passo fundo: Embrapa Trigo. 92 p.
- Mishra, R.K., Singhal, G.S. (1992). Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under light and heat stress and its relationship with peroxidation of thylakoid lipids. *Plant Physiology*. 98: 1-6.
- Mohammadi, M., Karimizadeh, R., Shefazadeh, M.K., Sadeghzadeh, B. (2011). Statistical analysis of durum wheat yield under semi-warm dryland condition. *Australian Journal of Crop Science*. 5: 1292-1297.
- Moore, D.P. (1972). Mechanisms of micronutrient uptake by plants. In *Micronutrients in Agriculture* (J.J. Mortvedt, P.M. Giordano, W.L. Lindsay, eds.). Soil Science Society of America, Madison, Wis., 17.
- Mora, A.M., Arora, M., Harley, K.G., Kogut, K., Parra, K., Hernández-Bonilla, D., Gunier, R.B., Bradman, A., Smith, D.R., Eskenazi, B. (2015). Prenatal and postnatal manganese teeth levels and neurodevelopment at 7,9, and 10.5 years in the CHAMACOS cohort. *Environment International*. 84: 39-54.
- Moranco, J. (2000). Production et commercialization du blé dur dans le monde. In: *Durum Wheat Improvement in Mediterranean Region*, New Challenges, Di Fonzo, N., Kaan, F., Nachit, M. (Eds.), CIHEAM, Zaragoza. Options Méditerranéennes A.40: 19-34.
- Moreno, E.A.C. (2011). Caracterización de las prolaminas en variedades indígenas españolas de trigo duro (*Triticum turgidum* (L.) Tell.) y su relación con la calidad semolera. Trabajo Fin de Máster. Universidad Politécnica de Valencia, València, 69 p.
- Morgounov, A.I., Belan, I., Zelenskiy, Y., Roseeva, L., Tomoskozi, S., Békés, F., Abugalieva, A., Cakmak, I., Vargas, M., Crossa, J. (2013). Historical changes in grain yield and quality of Spring wheat varieties cultivated in Siberia from 1900 to 2010. *Canadian Journal of Plant Science*. 93: 425-433.
- Nakamura, A., Miyado, K., Nasu, M., Kono, T., Umezawa, A. (2015). Phosphorus-insufficient maternal milk is associated with ectopic expression of collagen I and female-specific bony changes in infant mouse cartilages. *Regenerative Therapy*. 1: 5-10.
- Narwal, R.P., Dahiya, R.R., Malik, R.S., Kala, R. (2012). Influence of genetic variability on zinc, iron and manganese responses in wheat. *Journal of Geochemical Exploration*. 121: 45-48.
- Nhung, Mai-Thi-My, Ponnampereuma, F.N. (1966). Effects of calcium carbonate, manganese dioxide, ferric hydroxide, and prolonged flooding, chemical and electrochemical changes and growth of rice in a flooded, acid sulfate soil. *Soil Science*. 102: 29-41.

- Novaro, P., D'Egidio, M.G., Bacci, L., Mariani, B.M. (1997). Genotype and environment: their effect on some durum wheat quality characteristic. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 51: 247-252.
- NP 516 (2000) - Cereais e derivados. Determinação do teor de água. Método prático de referência. Instituto Português da Qualidade, 5p.
- NP 519 (1993) - Cereais e derivados. Determinação do teor de cinza a 900 °C. Processo corrente. Lisboa IPQ 5 p.
- Núñez, V.M.M. (2003). Influencia del régimen hídrico sobre parámetros de la calidad del trigo duro (*Triticum durum* Desf.) en ambiente mediterráneo. Granada University, Spain.
- Oliver, J.R., Blakeney, A.B., Allen, H.M. (1993). The colour of flour streams as related to ash and pigment contents. *Journal of Cereal Science*. 17: 169-182.
- Olsen, S.R. (1972). Micronutrient interactions. In *Micronutrients in Agriculture* (J.J. Mortvedt, P.M. Giordano, W.L. Lindsay, eds.). Soil Science Society of America, Madison, Wis., 243.
- Ortolan, F. (2006). *Genótipos de trigo do Paraná – Safra 2004: Caracterização e fatores relacionados à alteração de cor de farinha*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 140 p.
- Osborne, T.B. (1907). Proteins of the wheat kernel. *Carnegie Institution Washington Publications*. 84: 1-119.
- Ozturk, L., Yazici, M.A., Yucel, C., Torun, A., Cekic, C., Bagci, A., Ozkan, H., Braun, H., Sayers, Z., Cakmak, I. (2006). Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. *Physiologia Plantarum*. 128: 144-152.
- Pagnotta, M.A., Blanco, A., Gadaleta, A., Fares, C. (2005). Functional determinants of grain quality. In: Royo, C., Nachit, M.M., Di Fonzo, N., Araus, J.L., Pfeiffer, W.H., Slafer, G.A. (Eds.), *Durum Wheat Breeding - Current Approaches and Future Strategies*. Food Products Press, Binghampton, pp. 483-527.
- Pal, A. (2014). Copper toxicity induced hepatocerebral and neurodegenerative diseases: An urgent need for prognostic biomarkers. *NeuroToxicology*. 40: 97-101.
- Pallarés, M.G., León, A.E., Rosell, C.M. (2007). Trigo. In: *De Tales Harinas, Tales Panes: Granos, harinas e productos de panificación en Iberoamérica*. Córdoba. Argentina.
- Panozzo, J.F., Eagles, H.A. (2000). Cultivar and environmental effects on quality characters in wheat. II. Protein. *Australian Journal of Agricultural Research*. 51: 629-636.
- Petterson, D.S., Makintosh, J.B. (1994). The chemical composition and nutritive value of Australian grain legumes. *Grains Research and Development*. Corporation: Brisbane, Australia, pp. 38-41.
- Pinheiro, N., Costa, R., Almeida, A.S., Coutinho, J., Gomes, C., Maças, B. (2013). Durum wheat breeding in Mediterranean environments - influence of climatic variables on quality traits. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 25: 962-973.

- Playne, M.J., Crittenden, R. (1996). Commercially available Oligosaccharides. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 313: 10-22.
- Ponnamperuma, F.N. (1976). Screening rice for tolerance to mineral stress, paper presented at Workshop on Plant Adaptation to Mineral Stress in Problem Soils, Wright, M.J., Ed., Cornell University, Ithaca, N.Y. 341.
- Posner, E.S. (2000). Wheat. In: Kulp, K; Ponte, J.G. Handbook of Cereal Science and Technology. New York: Marcel Dekker. pp. 1-29.
- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*. 12(1): 29-36.
- Prabhasankar, P., Kumar, M.V., Lokesh, B.R., Rao, P.H. (2000). Distribution of free lipids and their fractions in wheat flour milled streams. *Food Chemistry*. 71: 97-103.
- Prange, R.K. (1986). Chlorophyll fluorescence *in vivo* as an indication of water stress in potato leaves. *American Potato Journal*. 63: 325-333.
- Pravst, I. (2011). Risking public health by approving some health claims? - The case of phosphorus. *Food Policy*. 36: 726-728.
- Ramalho, J.C., DaMatta, F.M., Dias, A., Scotti-Campos, P., Pais, I., Batista-Santos, P., Partelli, F.L., Ribeiro, A., Lidon, F.C., Leitão, A.L. (2014). Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. Plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. 26/1: 5-18.
- Ramalho, J.C., Rodrigues, A.P., Semedo, J.N., Pais, I.P., Martins, L.D. (2013). Sustained Photosynthetic Performance of *Coffea* spp. Under Long-Term Enhanced [CO<sub>2</sub>]. *PLOS ONE* 8(12): e82712.
- Rao, V.K., Mulvaney, S.J., Dexter, J.E., Edwards, N.M., Peressini, D. (2001). Stress-relaxation properties of mixograph semolina-water doughs from durum wheat cultivars of variable strength in relation to mixing characteristics, bread-making and pasta-making performance. *Journal of Cereal Science*. 34: 215-232.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (2005). Biology of Plants. 7<sup>th</sup> ed. W.H. Freeman and Company Publishers (New York). 686 pp.
- Rharrabti, Y., Villegas, D., Royo, C., Martos-Núñez, V., García del Moral, L.F. (2003). Durum wheat quality in Mediterranean environments II. Influence of climatic variables and relationships between quality parameters. *Field Crops Research*. 80: 133-140.
- Ribeiro, V.S.S. (2010). Desenvolvimento de um blend de café com potencial impacto positivo para a saúde pública. Dissertação para a obtenção do Grau de Doutor em Qualidade Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Robson, A.D., Reuter, D.J. (1981). Diagnosis of copper deficiency and toxicity. In *Copper in Soils and Plants* (J.F. Loneragan, A.D. Robson, R.D. Graham, eds.), pp. 287-312. Academic Press, London.

- Roncallo, P., Garbus, I., Picca, A., Echenique, V., Carrera, D.A., Cervigni, G.L., Miranda, R. (2009). Análisis de las bases genéticas del color en trigo candeal. *Revista de la Facultad de Agronomía / La Plata*. Buenos Aires 108: 9-23.
- Rosado, J.L., Cassis, L., Solano, L., Duarte-Vazquez, M.A. (2005). Nutrient addition to corn masa flour: Effect on corn flour stability, nutrient loss, and acceptability of fortified corn tortillas. *Food Nutrition Bulletin*. 26: 266-272.
- Rosado, J.L., Hambidge, K.M., Miller, L.V., Garcia, O.P., Westcott, J., Gonzalez, K., Conde, J., Hotz, C., Pfeiffer, W., Ortiz-Monasterio, I., Krebs, N.F. (2009). The quantity of zinc absorbed from wheat in adult women is enhanced by biofortification. *Journal of Nutrition*. 139: 1920-1925.
- Rosenfelder, P., Eklund, M., Mosenthin, R. (2013). Nutritive value of wheat and wheat by-products in pig nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 185: 107-125.
- Ruano, A., Poschenrieder, Ch., Barcelo, J. (1988). Growth and biomass partitioning in zinc-toxic bush beans. *Journal of Plant Nutrition*. 11: 577-588.
- Saltzman, A., Birol, E., Bouis, H.E., Boy, E., Moura, F.F., Islam, Y., Pfeiffer, W.H. (2013). Biofortification: Progress toward a more nourishing future. *Global Food Security*. 2: 9-17.
- Sapirstein, H.D., David, P., Preston, K.R., Dexter, J.E. (2007). Durum wheat breadmaking quality: Effects of gluten strength, protein composition, semolina particle size and fermentation time. *Journal of Cereal Science*. 45: 150-161.
- Schiweck, H., Bar, A., Vogel, R., Schwarz, E., Kunz, M. (1994). Sugar alcohols. In: Elvers, B., Hawkins, S., Russey, W. (Ed.). *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry*. Weinheim: VCH. 5 (25): 413-437.
- Schneider, J.S., Williams, C., Ault, M., Guilarte, T.R. (2015). Effects of chronic manganese exposure on attention and working memory in non-human primates. *NeuroToxicology*. 48: 217-222.
- Schreiber, U. (2004). Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview. In: Papageorgiou GC, Govindjee, eds. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. The Netherlands: Springer. pp. 279-319.
- Scotti-Campos, P., Semedo, J.N., Pais, I.P., Oliveira, M., Passarinho, J., Santos, M., Almeida, A.S., Costa, A.R., Pinheiro, N., Bagorro, C., Coco, J., Costa, A., Coutinho, J., Maças, B. (2015). Physiological responses to drought in four developed *Triticum aestivum* groups. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 27(2): 178-185.
- Sgarbieri, V.C. (1987). Alimentação e Nutrição. Factor de saúde e desenvolvimento, Almed Editora e Livraria Lda, São Paulo. 387 p.
- Shewry, P.R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*. 60: 1537-1553.
- Shewry, P.R., Halford, N.G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*. 53(270): 947-958.

- Shewry, P.R., Halford, N.G., Lafiandra, D. (2006). The high-molecular-weight subunits of glutenin. In: Gliadin and glutenin: The unique balance of wheat quality. Wrigley, C., Békés, F., Bushuk, W. (Eds). AACC International: St. Paul, Minnesota. pp. 143-169.
- Shewry, P.R., Tatham, A.S. (1990). The prolamin storage proteins of cereal seeds, structure and evolution. *Biochemical Journal*. 267: 1-12.
- Shewry, P.R., Tatham, A.S., Forde, J., Kreis, M., Mifflin, B.J. (1986). The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *Journal of Cereal Science*. 4: 97-106.
- Sieber, A., Würschum, T., Longin, C.F.H. (2015). Vitreosity, its stability and relationship to protein content in durum wheat. *Journal of Cereal Science*. 61: 71-77.
- Silva, R.C. (2003). *Qualidade Tecnológica e estabilidade oxidativa de farinha de trigo e fubá irradiados*. Dissertação. Universidade de São Paulo, São Paulo. 107 p.
- Simone, V.D., Menzo, V., Leonardis, A.M.D., Ficco, D.B.M., Trono, D., Cattivelli, L., Vita, P.D. (2010). Different mechanisms control lipoxygenase activity in durum wheat kernels. *Journal of Cereal Science*. 52: 121-128.
- Sissons, M. (2004). Pasta. Tamworth Agricultural Institute, Tamworth.
- Sissons, M. (2008). Role of durum wheat composition on the quality of pasta and bread. *Global Science Books*. 2: 75-90.
- Smith, G.S., Cornforth, I.S., Henderson, H.V. (1984). Iron requirements of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *New Phytologist*. 97: 543-556.
- Souza, E.J., Martin, J.M., Guttieri, M.J., O'Brien, K.M., Habernicht, D.K., Lanning, S.P., McLean, Carlson, R.G.R., Talbert, L.E. (2004). Influence of genotype, environment, and nitrogen management on spring wheat quality. *Crop Science*. 44(2): 425-428.
- Sperotto, R.A., Ricachenevsky, F.K., Waldow, V.A., Fett, J.P. (2012). Iron biofortification in rice: It's a long way to the top. *Plant Science*. 190: 24-39.
- Sramková, Z., Gregová, E., Sturdík, E. (2009). Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*. 2(1): 115-138.
- Sreenivasulu, K., Raghu, P., Ravinder, P., Nair, K.M. (2008). Effect of dietary ligands and food matrices on zinc uptake in Caco-2 cells: Implications in assessing zinc bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 10967-10972.
- Stirbet, A., Govindjee (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 104: 236-257.
- Stomph, T.J., Choi, E.Y., Stangoulis, J.C.R. (2011). Temporal dynamics in wheat grain zinc distribution: is sink limitation the key?. *Annals of Botany*. 107(6): 927.

- Stone, P.J., Nicolas, M.E. (1994). Wheat cultivars vary widely in their responses of grain yield and quality to short periods of post-anthesis heat stress. *Australian Journal of Plant Physiology*. 21: 887-900.
- Struminska-Parulska, D.I. (2015). Determination of  $^{210}\text{Po}$  in calcium supplements and the possible related dose assessment to the consumers. *Journal of Environmental Radioactivity*. 150: 121-125.
- Stuknytè, M., Cattaneo, S., Pagani, M.A., Marti, A., Micard, V., Hogenboom, J., De Noni, I. (2014). Spaghetti from durum wheat: Effect of drying conditions on heat damage, ultrastructure and in vitro digestibility. *Food Chemistry*. 149: 40-46.
- Stuper-Szablewska, K., Busko, M., Góral, T., Perkowski, J. (2014). The fatty acid profile in different wheat cultivars depending on the level of contamination with microscopic fungi. *Food Chemistry*. 153: 216-223.
- Sundby, C., Melis, A., Mäenpää, P., Andersson, B. (1986). Temperature-dependent changes in antenna size of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 851: 475-483.
- Svihus, B., Uhlen, A.K., Harstad, O.M. (2005). Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 122: 303-320.
- Symons, S.J., Dexter, J.E. (1991). Computer analysis of fluorescence for the measurement of flour refinement as determined by flour ash content, flour grade color, and tristimulus color measurements. *Cereal Chemistry*. 68(5): 454-460.
- Taylor, G.J., Foy, C.D. (1985). Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum*. *Canadian Journal of Botany*. 63: 1271-1275.
- Thiel, H., Finck, A. (1973). Ermittlung von Grenzwerten optimaler Kupferversorgung für Hafer und Sommergerste. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 134: 107-125.
- Thomas, G., Stark, H., Wellenreuther, G., Dickinson, B.C., Kupper, H. (2013). Effects of nanomolar copper on water plants - Comparison of biochemical and biophysical mechanisms of deficiency and sublethal toxicity under environmentally relevant conditions. *Aquatic Toxicology*. 140-141: 27-36.
- Tiffin, L.O. (1977). The form and distribution of metals in plants: an overview, in Proc. Hanford Life Sciences Symp. U.S. Department of Energy, Symposium Series, Washington, D.C., 315.
- Tinker, P.B. (1981). Levels, distribution and chemical forms of trace elements in food plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. London, 294b, 41.
- Tonon, V.D. (2010). *Herança genética e estabilidade de características relacionadas à qualidade dos grãos e da farinha de trigo*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. 132 p.
- Torbica, A., Hadnadev, M., Hadnadev, T.D. (2011). Possibility of using durum wheat flour as an improvement agent in bread making process. *Procedia Food Science*. 1: 1628-1632.

- Toussaint-Samat, M. (1992). *A History of Food*. Blackwell Publishers, UK.
- Triboi, E., Abad, A., Lloveras, J., Ollier, J.L., Daniel, C. (2000). Environmental effects on the quality of two wheat genotypes: 1. Quantitative and qualitative variation of storage proteins. *European Journal of Agronomy*. 13: 47-64.
- Tsonev, T., Lidon, F.J.C. (2012). Zinc in plants - An overview. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 24(4): 322-333.
- Tsuzuki, W., Suzuki, Y., Yamada, S., Kano, S., Ohnishi, H., Fujimoto, T., Horigane, A. (2014). Effect of oxygen absorber on accumulation of free fatty acids in brown rice and whole grain wheat during storage. *Food Science and Technology*. 58: 222-229.
- Van Kooten, O., Snel, J.F.H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*. 25: 147-150.
- Velu, G., Ortiz-Monasterio, I., Cakmak, I., Hao, Y., Singh, R.P. (2014). Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *Journal of Cereal Science*. 59: 365-372.
- Velu, G., Singh, R., Huerta-Espino, J., Peña, J., Ortiz-Monasterio, I. (2011). Breeding for Enhanced Zinc and Iron Concentration in CIMMYT Spring Wheat Germplasm. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 47: S174-S177.
- Venora, G., Grillo, O., Saccone, R. (2009). Quality assessment of durum wheat storage centres in Sicily: Evaluation of vitreous, starchy and shrunken kernels using an image analysis system. *Journal of Cereal Science*. 49: 429-440.
- Walker, D.A. (1988). The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. *Research Institute of Photosynthesis*. University of Sheffield.
- Welch, R.M., Graham, R.D. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*. 55(396): 353-364.
- Welch, R.M., Graham, R.D. (2005). Agriculture: the real nexus for enhancing bioavailable micronutrients in food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 18: 299-307.
- White, P.J. (2012). Long-distance transport in the xylem and phloem. *In: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd Ed., P. Marschner, London: Academic Press, 49-70.
- White, P.J., Broadley, M.R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*. 182: 49-84.
- Wisselink, H.W., Weusthuis, R.A., Eggink, G., Hugenholtz, J., Grobben, G.J. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*. 12: 151-161.



- Wrigley, C.W., Békés, F., Bushuk, W. (2006). Gluten: a balance of gliadin and glutenin. In: Gliadin and glutenin: The unique balance of wheat quality. Wrigley, C., Békés, F., Bushuk, W. (Eds). AACC International: St. Paul, Minnesota. pp. 3-32.
- Wrigley, C.W., Blumenthal, C., Gras, P.W., Barlow, E.W.R. (1994). Temperature variation during grain filling and changes in wheat-grain quality. *Australian Journal of Plant Physiology*. 21: 875-885.
- Wu, Z., Baelos, G.S., Lin, Z.-Q., Liu, Y., Yuan, L., Yin, X., Li, M. (2015). Biofortification and phytoremediation of selenium in china. *Frontiers in Plant Science*. 6: 136.
- Xie, X., Cui, S.W., Li, W., Tsao, R. (2008). Isolation and characterization of wheat bran starch. *Food Research International*. 41: 882-887.
- Yadav, R.S., Patel, A.M., Dodia, I.N., Aglodiya, A.V., Patel, G.A., Augustine, N. (2011). Agronomic bio-fortification of wheat (*Triticum aestivum* L.) through iron and zinc enriched organics. *Journal of Wheat Research*. 3: 46-51.
- Yamauchi, M. (1989). Rice bronzing in Nigeria caused by nutrient imbalances and its control by potassium sulfate application. *Plant Soil*. 117: 275-286.
- Yordanov, I., Velikova, V., Tsonev, T. (1999). Influence of drought, high temperature and carbamide cytokinin 4-PU-30 on photosynthetic activity of bean plants. 1. Changes in chlorophyll fluorescence quenching. *Photosynthetica*. 37: 447-457.
- Youdim, K.A., Martin, A., Joseph, J.A. (2000). Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 18 (4-5): 383-99.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*. 14: 415-421.
- Zayas, J.F., Lin, C.S. (1989). Water retention of two types of hexane-defatted corn germ proteins and soy protein flour. *Cereal Chemistry*. 66: 51-55.
- Zhang, Y., Guo, X., Tian, X., Liu, A., Jia, L. (2015). Carboxamidoquinoline–coumarin derivative: A ratiometric fluorescent sensor for Cu (II) in a dual fluorophore hybrid. *Sensors and Actuators B*. 218: 37-41.
- Zhang, Y., Shi, R., Md Rezaul, K., Zhang, F., Zou, C. (2010). Iron and zinc concentrations in grain and flour of winter wheat as affected by foliar application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 12268-12274.
- Zhi-ying, D., Liang, Z., Bin, L., Kun-pu, Z., Jian-sheng, C., Hou-lan, Q., Cai-ling, S., Yong-xiang, Z., Ji-chun, T. (2013). Conditional QTL Mapping of Sedimentation Volume on Seven Quality Traits in Common Wheat. *Journal of Integrative Agriculture*. 12(12): 2125-2133.
- Zlatev, Z., Lidon, F.C. (2012). An overview on drought induced changes in plant growth, water relations and photosynthesis. *Plant Science*. 24(1): 57-72.

- Zook, E.G., Greene, F.E., Morris, E.R. (1970). Nutrient composition of selected wheats and wheat products. *Cereal Chemistry*. 47, 72.
- Zou, C.Q., Zhang, Y.Q., Rashid, A., Ram, H., Savasli, E., Arisoy, R.Z., Ortiz-Monasterio, I., Simunji, S., Wang, Z.H., Sohu, V., Hassan, M., Kaya, Y., Onder, O., Lungu, O., Mujahid, M.Y., Joshi, A.K., Zelenskiy, Y., Zhang, F.S., Cakmak, I. (2012). Biofortification of wheat with zinc through zinc fertilization in seven countries. *Plant Soil*. 361: 119-130.